



## **Fischgesundheit – eine Herausforderung für alle**

Tagungsband der XVII. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektionen der  
European Association of Fish Pathologists EAFP

**3.10. bis 5.10. Oktober 2018 in Fribourg, Schweiz**

Für die Erstellung des Tagungsbandes wurden die von den Referenten zur Verfügung gestellten Manuskripte verwendet.

Für einige Tagungs-Beiträge wurden keine Manuskripte eingesandt. Für diese Beiträge wurden die Zusammenfassungen für den Abstractband genutzt. Die entsprechenden Beiträge sind im Inhaltsverzeichnis mit „ZF“ gekennzeichnet.

**Herausgeber:**

Thomas Wahli, Brückenstrasse 1, 3005 Bern  
Constanze Pietsch, HAFL, 3052 Zollikofen

**Zitiervorschlag:**

Wahli Thomas und Pietsch Constanze (Hrsg.) (2021). Fischgesundheit – eine Herausforderung für alle. Tagungsband der XVII. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektionen der European Association of Fish Pathologists EAFP. 3.10. bis 5.10. Oktober 2018 in Fribourg, Schweiz

**Fischgesundheit – eine Herausforderung für alle**

**Tagungsband der XVII. Gemeinschaftstagung der**

**Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektionen der**

**European Association of Fish Pathologists EAFP**

**3.10. bis 5.10. Oktober 2018 in Fribourg, Schweiz**

**Tagungsleitung**

Thomas Wahli, Bern  
Constanze Pietsch, Zollikofen  
Heike Schmidt-Posthaus, Bern

**Tagungsorganisation**

Thomas Wahli, Bern  
Constanze Pietsch, Zollikofen  
Heike Schmidt-Posthaus, Bern  
Nicolas Diserens, Moosseedorf  
Beat von Siebenthal, Bolligen

**Tagungsort**

Au Parc Hotel, Route de Villars 37, 1700 Fribourg, Schweiz

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis .....   | 2  |
| Vorwort.....   | 7  |
| Vorträge: Krankheiten - Alte Bekannte und neue Probleme .....  | 9  |
| 40 Jahre Diagnostik von Fischkrankheiten in der Schweiz .....  | 10 |
| Untersuchung verschiedener Fischzelllinien zur Replikation von<br>Cypriniden Herpesvirus-3 (ZF)* .....   | 18 |
| Hypnos trifft Thanatos: Infektionen von Karpfen mit dem Carp Edema<br>Virus und die Schlafkrankheit der Karpfen .....  | 20 |
| Die Diagnostik des “carp edema virus (CEV)” in Deutschland (ZF) .....  | 27 |
| Epidemiologische Untersuchungen zum Auftreten und zur Pathogenität<br>vom Carp Edema Virus (CEV) in Fischen in Deutschland.....  | 28 |
| Erster bestätigter Nachweis des Salmonid Alphavirus in Österreich und<br>beim Eismeersaibling ( <i>Salvelinus alpinus</i> ) (ZF).....  | 32 |
| Koinfektionen mit Piscine orthoreovirus 1 und 3 in Salmoniden mit<br>Furunkulose in Deutschland (ZF). .....  | 33 |
| <i>Flavobacterium branchiophilum</i> als sekundärer Erreger bei koi sleepy<br>disease (ZF) .....   | 35 |
| Flavobakterien und Wasserhärte bei Koi (und anderen Süßwasserfischen?)<br>- Beobachtungen aus der Praxis.....  | 37 |
| Fischtuberkulose in zwei Zoologischen Gärten – Pathologie und beteiligte<br>Mykobakterienspezies .....   | 41 |
| Herausforderungen bei der Identifizierung von Vibrionen aus<br>Kreislaufanlagen für tropische Riesengarnelen ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )<br>mit standarddiagnostischen Methoden..... | 49 |
| Fischsterben durch <i>Saprolegnia</i> -Infektionen in der Schweiz: Was steckt<br>dahinter? .....   | 53 |
| Vorträge: Therapie im Wandel der Zeit.....   | 61 |
| Entwicklung und Testung eines Lebendimpfstoffes gegen das<br>Koiherpesvirus.....   | 62 |
| Proteasen als alternative Desinfektionsmittel gegen Fischviren? (ZF)...  | 63 |
| Entwicklung alternativer Bekämpfungsstrategien gegen <i>Ichthyophthirius</i><br><i>multifiliis</i> (ZF).....   | 65 |



|  |     |
|--|-----|
| Biosicherheit in der Aquakultur - rechtliche Anforderungen an Reinigung und Desinfektion.....  | 67  |
| Antibiotikaresistenzen in von Zier- und Speisefischen isolierten Bakterien zwischen 2005 und 2017 .....  | 75  |
| Risikomanagement zur Minimierung von krankheitsbedingten Verlusten in der Aquakultur neuer Fischarten – Identifizierung von relevanten Pathogenen.....   | 79  |
| Vorträge: Klimawandel, Umwelt und Fischgesundheit.....   | 85  |
| Climate Trout: Kombinierte Effekte von Klimawandel und <i>Malacosporea</i> -Infektionen auf wilde Bachforellenpopulationen (ZF) .....  | 86  |
| Temperatur und PKD abhängige Variationen in Bachforellen in Baden-Württemberg? (ZF).....   | 88  |
| Bisher unbekannte Mykotoxine – Welche Gefahr geht von ihnen aus ?  | 89  |
| Vorträge Fish Welfare .....  | 91  |
| Stress im Fischhirn .....  | 92  |
| Klassifizierung des Bewegungs-, Fütterungs- und Sozialverhaltens von Karpfen und Koi bei physiologischen Bedingungen und nach Beeinflussung durch eine Infektion .....                         | 96  |
| Einfluss von Environmental Enrichment auf das Fischwohl in Speisefischzuchtbetrieben.....  | 100 |
| Einfluss von Mikroalgen-Fütterung auf das Wachstum und die Gesundheit von Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....  | 108 |
| Tierschutzgerechtes Betäuben und Töten von Riesengarnelen <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931) – Vergleich von Hypothermie und Elektrobetäubung (ZF).....                                 | 112 |
| Indexmodell zur Bewertung des Tierwohls von Regenbogenforellen ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) in der Aquakultur (IBETA) (ZF).....  | 114 |
| Fische und Fütterungsstress – ein molekularbiologischer Ansatz (ZF)  | 116 |
| Evaluation von Betäubung und Schlachtung und den damit in Zusammenhang stehenden Tätigkeiten für Karpfen ( <i>Cyprinus carpio</i> ) und Regenbogenforellen ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )..... | 118 |
| Vorträge: Freie Themen.....  | 124 |
| Genetische Erfolgskontrolle der Seeforellenbesatzpraktik im Zürichsee .....  | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| Innovative Methoden zur Wasserqualitätsverbesserung in Kreislaufanlagen (ZF).....  | 128 |
| Molecular characterization of CD4 homologue in brown trout ( <i>Salmo trutta</i> ) (ZF).....   | 130 |
| Das Gegenteil von gut ist gut gemeint - „Gut“ desinfiziert in den Tod (ZF) .....   | 132 |
| Rekombinante Zytokine als molekulare Adjuvantien für Fischimpfstoffe .....   | 134 |
| EU-Tiergesundheitsrechtsakt – welche Herausforderungen stehen uns ab 2021 bevor? .....   | 136 |
| Antivirale Wirkungen von 25 Hydroxycholesterin in Fischzellen (ZF). .....  | 144 |
| MALDI-TOF MS Identifizierung von bakteriellen Erregern .....   | 146 |
| Effekt von <i>Tylodelphys clavata</i> auf Sehvermögen und Beuteauswahl bei experimentell infizierten Flussbarschen .....                                     | 151 |
| Schlechte Lagerung – Schlechte Fischfutter? .....  | 159 |
| Krankheit durch Abwasser? Untersuchung des Abwassereinflusses auf eine Parasiteninfektion bei Wildfischen .....  | 162 |
| Tierärztliche Betreuung von Fischen und anderen aquatischen Tieren in Großaquarien .....   | 170 |
| Weiterbildung zum Diplomate of Aquatic Animal Health – Eine Konkurrenz für den deutschen Fachtierarzttitle? (ZF).....  | 174 |
| Poster: Krankheiten - Alte Bekannte und neue Probleme.....   | 176 |
| Diagnostische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von <i>Shewanella</i> spp. ....   | 182 |
| Diagnostische Methoden zur Identifizierung von <i>Aeromonas</i> spp. und Untersuchungen zur Pathogenität, Zytotoxizität und Adhäsion an Fischmukus (ZF)..... | 184 |
| Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) in Zierfischen in Deutschland (ZF).....  | 186 |
| Apoptose, Geisterzellen oder doch Einzeller? (ZF).....   | 188 |
| Immunreaktionen auf carp edema virus Infektion bei Karpfen - ein Modell für eine Immunsuppression? (ZF).....   | 189 |

|   |     |
|---|-----|
| Evaluierung neuer Virusinfektionsmodelle für Zebrafische (ZF).....  | 191 |
| Kiemenentzündungen beim Huchen ( <i>Hucho hucho</i> ) mit assoziierten Epitheliocystis-Strukturen im Kiemenepithel (ZF).....  | 193 |
| Ist das common carp paramyxovirus nur ein sekundärer Erreger bei Fischen, die von koi sleepy disease betroffen sind? .....  | 194 |
| Erste Nachweise des carp edema virus in Ungarn, Litauen, Kroatien und Serbien bestätigen eine sehr weite Verbreitung des Virus in Karpfenbeständen in Europa (ZF) .....                                     | 196 |
| Neue Zelllinien zum Nachweis von Viren in Karpfen (ZF) .....  | 198 |
| Flavobakterien in der Fischhaltung, Vorkommen, Diagnostik und Bedeutung.....  | 200 |
| <i>In vitro</i> Studien zur Empfänglichkeit verschiedener Forellenpopulationen gegenüber dem Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Forellen (VHS) und <i>Yersinia ruckeri</i> .....              | 205 |
| Ermittlung des Temperaturbereichs für eine optimale Replikation des carp edema virus der Entstehung einer klinischen koi sleepy disease Symptomatik (ZF) .....  | 209 |
| Erhebungen zur Verbreitung der Kaltwasser-Erdbeerkrankheit bei Regenbogenforellen (Red Mark Syndrome) in Bayern . (ZF) .....  | 211 |
| <i>Myxobolus koi</i> – erfolgreiche Therapie bei Tosai ( <i>C. carpio koi</i> ) mit Toltrazuril .....   | 213 |
| Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener <i>Vibrio</i> spp. aus Kreislaufanlagen für tropische Riesengarnelen ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....  | 217 |
| Poster: Fish Welfare .....  | 220 |
| Wirkung der Wasserozonisierung auf die Zuchtumgebung, die Produktion, den Gesundheitszustand und die Qualität von Fischfleisch bei Zandern ( <i>Sander lucioperca</i> ) im Rezirkulationssystem (RAS) ..... | 221 |
| Freies Cortisol im Wasser als Marker zur Stressbestimmung in der Aquakultur .....   | 223 |
| Poster: Neue Haltungsformen und Haltungsarten.....  | 228 |
| Untersuchungen zum Einfluss der Besatzdichte auf die Wachstumsleistung und Qualität von Afrikanischen Welsen ( <i>Clarias gariepinus</i> ) in Warmwasser-Kreislaufanlagen .....                             | 229 |

|  |     |
|--|-----|
| Untersuchungen zur Wasserqualität in Kreislaufanlagen durch den Einsatz eines Denitrifikationsfiltermediums (ZF) .....           | 234 |
| Poster: Klimawandel.....   | 235 |
| Vorläufige Erkenntnisse zum Bachforellensterben an der Isar (ZF).....  | 236 |
| Poster: Freie Themen.....  | 238 |
| Subtilisin reactions against koi herpesvirus (ZF).....   | 239 |
| Seq, drugs and PKD: An RNA – sequencing analysis of a biological and chemical stressor and their consequences for fish (ZF)..... | 241 |
| Der Einfluss organischer Düngung auf die Wasserqualität in Karpfenteichen (ZF) .....   | 242 |
| Teilnehmerverzeichnis.....   | 244 |
| Sponsorenliste.....  | 249 |

\*) Von den mit «ZF» bezeichneten Beiträgen liegen nur die Zusammenfassungen, welche für den Abstractband der Tagung eingereicht worden sind, vor.

## Vorwort

Die XVII Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektionen der European Association of Fish Pathologists (EAPF) wurde vom 3. bis zum 9. Oktober im Hotel Au Parc in Fribourg (Freiburg im Üechtland) durchgeführt. Die Tagung stand unter dem Motto «Fischgesundheit – eine Herausforderung für alle». Dieses Motto veranschaulicht, dass das Erhalten einer guten Gesundheit bei Wassertieren von zentraler Bedeutung ist, wobei hier der Ausdruck «Fisch» sehr weit gefasst werden muss, sind doch in den Tagungsthemen nicht nur Fische, sondern auch Krebstiere enthalten. Immer wieder treten neue Krankheiten sowohl bei freilebenden als auch bei unter menschlicher Obhut gehaltenen Wassertieren auf, was einerseits für die Wissenschaft andererseits aber auch für die Halter von solchen Tieren eine Herausforderung bedeutet. Ohne die Zusammenarbeit von Wissenschaft, Medizin, Haltung und Naturbehörden ist eine erfolgreiche Lösung solcher Probleme kaum möglich. Dabei geht es aber nicht nur um neue Probleme, sondern auch seit langem bekannte Krankheiten können immer wieder eine Herausforderung darstellen, sei es, weil erfolgreiche Therapien fehlen oder nicht mehr verfügbar sind, sei es, weil Probleme wieder neu auftreten. Dazu kommen immer wieder neue gesetzliche Vorgaben, die es zu berücksichtigen gilt, sowie neu definierte Ansprüche bezüglich Tierhaltung und Tierwohl. Mit dem breit gefächerten thematischen Angebot versuchte die Tagung, Einblicke in diese Herausforderungen zu geben. Dabei dienten nicht nur Vorträge und Poster der Wissensvermittlung. Ebenso wichtig waren die persönlichen Kontakte, die einen regen Austausch unter den Teilnehmenden ermöglichten.

Die Tagung begann mit einem abendlichen Begrüssungs-Apero im Tagungshotel. Am Mittwochmorgen wurde die Tagung offiziell mit einer Begrüssung durch die Organisatoren eröffnet. Anschliessend erfolgte eine Grussnote durch Willy Eyer, stellvertretender Dienstchef des Amtes für Wald, Wild und Fischerei als Vertreter des gastgebenden Kantons sowie durch Professor David Spreng, Dekan der Vetsuisse Fakultät Bern. Der anschliessende wissenschaftliche Teil gliederte sich in die folgenden thematischen Blöcke: Krankheiten – alte Bekannte und neue Probleme; Therapie im Wandel der Zeit; Klimawandel, Umwelt und Fischgesundheit; Fish Welfare/Tierschutz und freie Themen. Insgesamt wurden 42 Vorträge präsentiert. Ergänzt wurde das Programm durch 26 Poster, die während der ganzen Tagung einsehbar waren. Die Themenvielfalt widerspiegelt das grosse Interessenspektrum der Teilnehmer und der EAFP.

Neben dem wissenschaftlichen Teil spielt bei einer Tagung auch das Sozial-

Formatiert: Deutsch (Schweiz)

programm eine wichtige Rolle, erlaubt dieses doch einen persönlichen Austausch der Teilnehmer. Am frühen Donnerstagabend waren die Tagungsteilnehmer eingeladen, an einer Führung durch den historischen Teil der Stadt in einem Minizug teilzunehmen. Dank des guten Wetters präsentierte sich die Stadt von ihrer vorteilhaftesten Seite. Im Anschluss an diese Führung, folgte der Gesellschaftsabend im Saal Grenette im Zentrum der Stadt. Höhepunkt dieses Anlasses war die Verleihung der Prof. Wilhelm Schäperclaus Förderpreise für junge Forscher. Alle Tagungsteilnehmer hatten unter den teilnehmenden Beiträgen ihre Wahl treffen können. Dirk Willem Kleingeld übergab den Preis für den besten Vortrag an Linda Tschirren (Stress im Fischhirn; Autoren: Linda Tschirren, Constanze Pietsch, Andreas Seitz) und denjenigen für das beste Poster an Julia Bauer (Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener *Vibrio* spp. aus Kreislaufanlagen für tropische Riesengarnelen (*Litopenaeus vannamei*); Autoren: Julia Bauer, Felix Teitge, Lisa Neffe, Mikolaj Adamek, Arne Jung, Christina Pepler, Dieter Steinhagen, Verena Jung-Schroers). An dieser Stelle sei der Familie Gerda und Dr. Hartmut Stachowitz (†) sowie Herrn Oswald Fürneisen (†) für die Stiftung der Preise herzlich gedankt.

Am Samstag konnten Interessierte an einer Exkursion teilnehmen. Besichtigt wurde zunächst ein Fischlift an der Pérolles-Staumauer bei Fribourg. Anschliessend stand ein Besuch einer Forellenfischzucht (Pisciculture de la Gruyère) auf dem Programm. Dass die Fahrt zur Fischzucht durch den Alpbazug verlängert wurde, war zwar nicht vorgesehen worden, ergab aber einen netten Eindruck über die lokalen Gebräuche. Auf der Fischzuchtanlage wurden die Teilnehmenden mit einem feinen Aperó durch den Besitzer Albert Bossy empfangen. Ihm sei hier ganz herzlich gedankt. Letzter Programmpunkt war die Besichtigung der Schaukäserei von Gruyère, welche einen Eindruck über die Herstellung des Greyerzerkäses vermittelte.

Ohne Unterstützung in verschiedenster Hinsicht wäre die Tagung nicht durchführbar gewesen. Einerseits halfen zahlreiche Kolleginnen und Kollegen bei der Planung und Durchführung mit Rat und Tat mit. Andererseits konnte das Organisationsteam auf finanzielle Unterstützung durch Sponsoren zählen. Auch die Betreiber des Tagungshotels erwiesen sich als den Wünschen der Organisatoren gegenüber sehr offen und flexibel. Für all diese Hilfe und Unterstützung bedanken sich die Organisatoren ganz herzlich.

Thomas Wahli

Formatiert: Deutsch (Schweiz)

Vorträge: Krankheiten - Alte Bekannte und neue  
Probleme



## 40 Jahre Diagnostik von Fischkrankheiten in der Schweiz

Thomas Wahli, Heike Schmidt-Posthaus, Beat von Siebenthal, Helmut Segner

Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, Länggassstrasse 122, 3012 Bern, Schweiz

### Zusammenfassung

Die Nationale Untersuchungsstelle für Fischkrankheiten (NAFUS) wurde 1975 unter dem Druck der um sich greifenden Ulzerativen Dermalnekrose (UDN) bei wilden Bachforellen und dem häufigen Auftreten der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) an der Vetsuisse Fakultät Bern etabliert. Ab 1978 war die NAFUS vollständig einsatzfähig. Die diagnostischen Daten der NAFUS wurden von 1978 an in einer einheitlichen Form in einer Datenbank erfasst, was einen Überblick über 40 Jahre Diagnostik erlaubt.

Von 1978 bis 2017 wurden über 16'200 Einsendungen von Fischen und Krebsen aus privaten und staatlichen Fischzuchten, aus freien Gewässern, Teichen sowie aus Aquarien registriert. Regenbogenforellen, die wichtigste Zuchtfischart in der Schweiz, machten einen Anteil von 35% aus. 15% der Fälle betrafen Bachforellen, was den wichtigen Status dieser Art als einer der bedeutendsten Wildfische der Schweiz reflektiert.

Bei der Häufigkeit von Diagnosen stehen Infektionen durch Parasiten an erster Stelle, gefolgt von bakteriellen Problemen. In weniger als 5% aller Fälle wurden Virusinfektionen diagnostiziert.

Die Entwicklung über die Jahre zeigt einen deutlichen Rückgang der VHS. Demgegenüber ist bei der in der Schweiz bisher anzeigepflichtigen Infektiösen Pankreasnekrose (IPN) kein klarer Trend erkennbar. Die Anzahl Fälle von Infektiöser Hämato-poietischer Nekrose (IHN), einer auszurottenden Seuche wie VHS, blieb nach ihrem ersten Auftreten im Jahre 1993 gering. Andere virale Krankheiten, die über die Jahre neu in der Schweiz auftraten, waren Infektionen durch *Koi Herpes Virus* (KHV), *Salmonid Alpha Virus* (SAV), *Carp Edema Virus* (CEV), *Cyprinid Herpes Virus 2* und *Perch rhabdovirus*, alle in geringer Anzahl.

Unter den bakteriellen Krankheiten wurden Furunkulose, Bakterielle Nierenerkrankung (BKD), und Rotmaulseuche (ERM) regelmässig nachgewiesen, wobei die Anzahl Fälle von Furunkulose tendenziell leicht abnahm. Im Gegensatz dazu nahmen Probleme durch externe und systemische Flavobakterieninfektionen ständig zu.

Bei den Parasiten stehen Probleme bedingt durch *Ichthyobodo necator* (Costiose) und *Ichthyophthirius multifiliis* (Weisspünktchenkrankheit) in Fischzuchten und Aquarien sowie durch *Tetracapsuloides bryosalmonae*, dem Erreger der Proliferativen Nierenkrankheit (PKD), in Wildfischen im Vordergrund. Während die Zahl der Weisspünktchenkrankheiten ständig abnahm, ist bei Costiose und PKD kein Trend zu erkennen.

### Summary

The National Fish Disease Laboratory (NAFUS) was established in 1975 at the Vetsuisse Faculty in Berne due to the spread of ulcerative dermal necrosis (UDN) in wild brown trout and the frequent occurrence of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). The NAFUS was fully operational in 1978. The diagnostic data of the NAFUS from 1978 onwards were recorded in a database, which allows an overview of 40 years of diagnostics.

From 1978 to 2017, more than 16,200 submissions of fish and crayfish from private and governmental fish farms, from open waters, ponds and from aquaria were registered. Rainbow trout, the most important farmed fish species in Switzerland, accounted for 35% of the submissions. The 15% of brown trout cases reflect the status of this species as an important wild fish species in Switzerland.

The frequency of diagnoses is dominated by parasitic infections, followed by bacterial problems. Virus infections were diagnosed in less than 5% of all cases.

The development over the years shows a clear decrease in VHS. On the other hand, no clear trend is discernible for infectious pancreatic necrosis (IPN), which has so far been notifiable in Switzerland. The number of cases of infectious haematopoietic necrosis (IHN), a disease to be eradicated as VHS, remained low after its first occurrence in 1993. Other viral diseases emerging in Switzerland over the years were infections with *Koi Herpes Virus* (KHV), *Salmonid Alpha Virus* (SAV), *Carp Edema Virus* (CEV), *Cyprinid Herpes Virus 2* and *Perch rhabdovirus*, all in low numbers.

Among the bacterial diseases, furunculosis, bacterial kidney disease (BKD), and red mouth disease (ERM) were regularly detected, with the number of furunculosis cases slightly decreasing over time. In contrast, problems caused by external and systemic flavobacterial infections increased steadily.

Concerning parasite infections, problems caused by *Ichthyobodo necator* (costiosis) and *Ichthyophthirius multifiliis* (white spot disease) in fish farms and aquaria and by *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the pathogen causing proliferative kidney disease (PKD) in wild fish, are in the foreground. While

the number of white spot disease outbreaks has steadily decreased, there is no trend in costiosis and PKD.

### **Geschichtliches**

Die Fischuntersuchungsstelle (NAFUS) wurde 1975 an der Abteilung für Geflügel-, Wild- und Fischkrankheiten am Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Bern etabliert. Dies geschah unter dem Druck der bei wilden Salmoniden um sich greifenden Ulzerativen Dermalnekrose (UDN) und der hohen Anzahl Fälle von Viraler Hämorrhagischer Septikämie (VHS). 1986 wechselte die Abteilung ans Institut für Pathologie. 1998 wurde der Geflügelteil nach Zürich ausgelagert und die Abteilung unter dem Namen Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI) in seiner heutigen Form etabliert. 2014 erhielt das FIWI den Status eines eigenen Institutes. Das FIWI feierte 2018 sein 20-jähriges Bestehen.

### **Methoden**

Seit 1978 wurden alle Diagnostikfälle einschliesslich Untersuchungsergebnisse einheitlich in einer Datenbank erfasst. Berücksichtigt wurden dabei immer Fälle, nicht Einzelfische, wobei ein Fall als Einsendung von Tieren oder Material einer Fischart und einer Herkunft (Becken in einer Fischzucht, Fluss, Aquarium) definiert wird. Die Daten von 1978 bis 1984 wurden dabei retrospektiv eingetragen. Bis Ende 2017 sind über 16'000 Fälle aufgenommen worden. Diese Datensammlung erlaubt Auswertungen nach verschiedenen Gesichtspunkten über eine Periode von 40 Jahren. Die nachfolgenden Angaben basieren auf dieser Datensammlung.

### **Resultate und Diskussion**

Die Hälfte (50%) aller Einsendungen stammte aus privaten Fischzuchten. Weitere Herkunftsorte waren Süss- und Salzwasser-Aquarien mit 20%, sowie „Freie Gewässer“ und „Teiche“ mit je 11%. Alle übrigen Herkunftstypen lagen deutlich unter 10%. Das Artenspektrum der untersuchten Fische war sehr breit, wobei die Anteile einzelner Arten sehr unterschiedlich verteilt waren. Regenbogenforellen machten mit 35% den grössten Anteil aus, gefolgt von Bachforellen mit über 16% und Süsswasserzierfischen mit über 13%. Regenbogenforellen sind in der Schweiz seit langem die wichtigste Zuchtfischart, während Bachforellen die häufigste und aus Anglersicht wichtigste Art in freien Gewässern ist.

Bei den Diagnosen zeigte sich ein zahlenmässig sehr unterschiedliches Bild. Bei über 40% aller Fälle wurden Parasiten festgestellt. Bei knapp 28% aller Einsendungen konnten Bakterien nachgewiesen werden, während bei lediglich 4% der Einsendungen Viren diagnostiziert wurden. Bei 15% der Einsendungen wurden Umwelt-bedingte Probleme gefunden. Zu berücksichtigen ist

bei dieser Zusammenstellung, dass der Nachweis eines Erregers nicht zwingend bedeutet, dass es sich dabei um ein Problem handelt. So werden z.B. häufig Parasiten in einem Befallsgrad nachgewiesen, der für die infizierten Fische keine deutliche Beeinträchtigung bedeutet. Weiter gilt es zu beachten, dass in sehr vielen Fällen Mehrfachinfektionen oder –probleme vorlagen, die in den angegebenen Zahlen nicht berücksichtigt werden.

Im Folgenden wird auf die Häufigkeit von Krankheiten bezogen auf die entsprechende Gruppe (nicht bezogen auf die Gesamtanzahl der Einsendungen) eingegangen.

Innerhalb der Virusinfektionen war die als auszurettend klassierte Virale Hämmorrhagische Septikämie (VHS), welche in erster Linie Salmoniden betrifft, mit knapp 58% die mit Abstand häufigste virale Krankheit. Die als zu bekämpfend eingestufte Infektiöse Pankreasnekrose (IPN) machte einen Anteil von gut 20% der Virusinfektionen aus. IPN verursacht in der Regel nur bei jungen Salmoniden Probleme, während das Virus bei älteren Tieren zwar nachweisbar, aber ohne erkennbare Folgen für die betroffenen Tiere ist. Der Anteil aller weiteren nachgewiesenen Viren an der Gesamtheit der Virusfunde, insbesondere auch derjenige von Infektiöser Hämatopoietischer Nekrose (IHN), einer weiteren auszurettenden Fischseuche, lag unter 10%.

Bei den bakteriellen Problemen standen Infektionen durch Flavobakterien (38%), insbesondere Infektionen der Kiemen (19%), im Vordergrund. Flavobakterien stellen hauptsächlich ein Problem in Fischzuchten dar. Bakterielle Mischinfektionen waren mit einem Anteil von 19% vertreten, wobei hier Tiere aller Herkunftstypen betroffen waren. Mykobakterien-Infektionen machten 10% der bakteriell bedingten Infektionen aus. Diese Bakteriengruppe wurde fast ausschliesslich bei Zierfischen diagnostiziert. Andere als problematisch angesehene Krankheiten wie Furunkulose (*Aeromonas salmonicida*), Rotmaulseuche (*Yersinia ruckeri*) und Bakterielle Nierenkrankheit (*Renibacterium salmoninarum*) lagen alle teils deutlich unter einem Anteil von 8%.

Bei den Pilz-bedingten Diagnosen stach der Anteil von *Saprolegnia* sp. mit einem Anteil von 55% hervor. *Saprolegnia* sp. wird häufig als Erreger von vorgeschwächten Tieren erachtet. Allerdings gab es in der Schweiz über einen Zeitraum von mehreren Jahren ab 2009 Massensterben von Fischen in Fliessgewässern, die auf einen *Saprolegnia parasitica* Befall zurückgeführt worden waren. Bei den betroffenen Tieren war keine Vorschwächung gefunden worden. Bei 27% der Pilz-Diagnosen konnte der Erreger nicht näher bestimmt werden. Der Anteil von Fällen mit einem Nachweis der neu zu Pilzen zugeordneten *Microspora* machte gut 12% aus.

Bei den parasitären Erregern wurden am häufigsten Ziliaten (29%), Flagellaten (24%) und Monogenea (24%) gefunden. Der Anteil aller anderen Stämme lag jeweils unterhalb von 5%. Die wichtigsten Vertreter der Ziliaten waren *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp. und *Chilodonella* sp.. Bei den Flagellaten waren die häufigsten Vertreter *Ichthyobodo necator* und *Spiroplasma* sp., während bei den Monogenea hauptsächlich *Gyrodactylus* sp. und *Dactylogyrus* sp. vertreten waren.

Unspezifische Kiemenschwellung war die mit Abstand häufigste Diagnose bei den umweltbedingten Problemen (Anteil an umweltbedingten Problemen 37%). Sehr unterschiedliche Ursachen können zu Kiemenschwellung führen, u.a. die Qualität des Wassers. Da das Bild der Veränderung aber auch durch Parasiten oder Bakterien hervorgerufen werden kann, ist nicht in jedem Fall ausgeschlossen, dass nicht Erreger ursächlich waren, aber nicht mehr nachzuweisen waren. Andere Diagnosen wie Vergiftungen, Gasblasenkrankheit oder Sauerstoffmangel machten alle weniger als 20% der Umweltbedingten Probleme aus.

Nachfolgend wird auf die Entwicklung der Diagnosehäufigkeiten über den Zeitraum 1978 bis 2017 eingegangen.

Bei den Virusinfektionen zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Fälle von VHS (Fig. 1). Von einem Maximum von 35 Fällen im Jahr 1979 reduzierten sich die Fallzahlen auf unter 5 Fälle pro Jahr ab 2013. Erklären lässt sich dieser Befund möglicherweise damit, dass die seit den späten 1970-iger Jahren durchgeführte Keulung von VHS-betroffenen Beständen den gewünschten Effekt hatten. Bei Infektiöser Hämorrhagischer Nekrose (IHN) und IPN, zwei ebenfalls meldepflichtige Krankheiten in der Schweiz, war dagegen kein klarer Trend erkennbar (Fig. 1). Die Verteilung über die Jahre war gekennzeichnet durch eine ständige Zu- und Abnahme. Insbesondere bei IPN könnte dies damit zusammenhängen, dass die Infektion häufig mit Importen in die Anlagen gelangte.

Im Verlaufe der Beobachtungsperiode gab es zahlreiche Erstnachweise von Viralen Krankheiten in der Schweiz. 1980 wurde erstmals die Frühlingsvirämie des Karpfens nachgewiesen. Mit drei weiteren Nachweisen bis Ende 2017 war diese Krankheit aber in der Schweiz unbedeutend, insbesondere auch, weil Karpfenzucht hierzulande kaum eine Rolle spielt. 1993 wurde der erste Fall von IHN registriert. Diese Krankheit trat seither unregelmässig, aber immer nur in sehr geringen Fallzahlen auf, dies im Gegensatz zur 2003 erstmals diagnostizierten *Cyprinid Herpesvirus 3* Infektion (Koi-Herpes Seuche oder KHV), welche seither regelmässig gefunden wurde. Betroffen waren fast ausschliesslich Koi aus Teichen. Weitere Neunachweise betrafen Koi Sleepy Disease verursacht durch das *Carp Edema Virus* (2007 retrospektiv,

seit 2016 regelmässig in Einzelfällen), Störherpesvirus (erstmalig 2009 und dann erneut in Einzelfällen 2010, 2013 und 2014), *Cyprinid Herpesvirus 2* Infektion (2011 und 2017), *Salmonid Alphavirus* (2013 und 2014), und *Perchirhabdovirus* Infektion (2013, 2017 und 2018).

Bei bakteriellen Infektionen zeigten sich nur bedingt Trends über die Zeit (Fig. 2). So ging die Anzahl von Furunkulosefällen nach einem Maximum im Jahr 1989 deutlich zurück und pendelte sich auf weniger als 10 Fälle pro Jahr

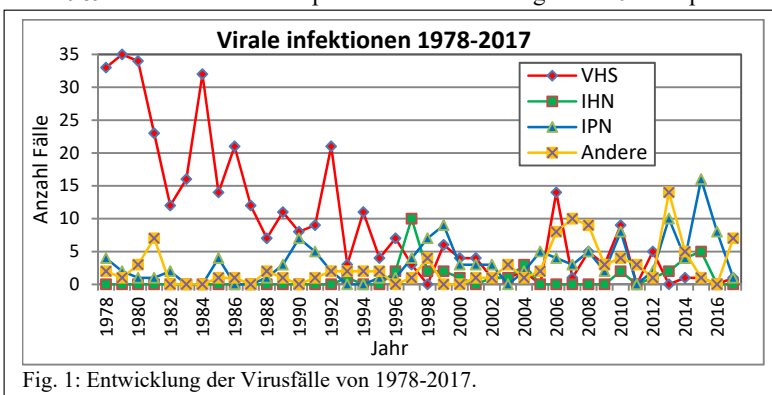


Fig. 1: Entwicklung der Virusfälle von 1978-2017.

ein. Sowohl bei der Bakteriellen Nierenkrankheit (BKD) als auch bei der Rotmaulseuche waren Schwankungen über die Jahre zu verzeichnen, es gab aber keinen klaren Trend. Etwas anders sieht das Bild bei den Flavobakterieninfektionen aus (Fig. 3). Nach Maximalwerten bei Kiemen- und Hautflavobakterieninfektionen in den Jahren 1988 respektive 1989 und anschliessendem klarem Rückgang der Fälle bis 2000 ist seit der Jahrtausendwende tendenziell eine Zunahme der Fälle zu verzeichnen. Dies trifft auch für die systemische Flavobakteriose (RTFS) zu, welche 1992 erstmals nachgewiesen wurde. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Krankheit schon früher Zuchtfische in der Schweiz betroffen hatte, aber noch nicht als RTFS erkannt worden war. Eine Untersuchung von Flavobakterien hat gezeigt, dass die Probleme in erster Linie durch *Flavobacterium psychrophilum* verursacht worden waren, während andere Flavobakterienarten in den Forellenanlagen kaum eine Rolle spielten. 2003 wurde in einer Fischzucht erstmals in der Schweiz *Lactococcus garvieae* nachgewiesen. Dieses Bakterium war vor allem aus Südeuropäischen Ländern als grosses Problem in Salmonidenzuchten bekannt. Auch im ersten Schweizer Fall hatte der Krankheitsausbruch zur Folge, dass die Anlage geschlossen werden musste. Das Bakterium wurde seither bei Forellen nicht mehr nachgewiesen, dafür 2010 bei Flussbarschen,

wo allerdings keine Massenmortalitäten verursacht worden waren. Ein weiterer Erstnachweis betraf *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* im Jahr 2015. Betroffen waren Tilapien. Es blieb aber bei diesem Einzelnachweis. Drei wichtige parasitäre Infektionskrankheiten wurden hinsichtlich ihrer zeitlichen Entwicklung analysiert: Ichthyophthiriasis, Costiasis und Proliferative Nierenkrankheit (PKD). Einzig bei Costiasis war ein leichter Trend zu einer Abnahme der Fälle gegen Ende der Beobachtungsperiode erkennbar. Bei der

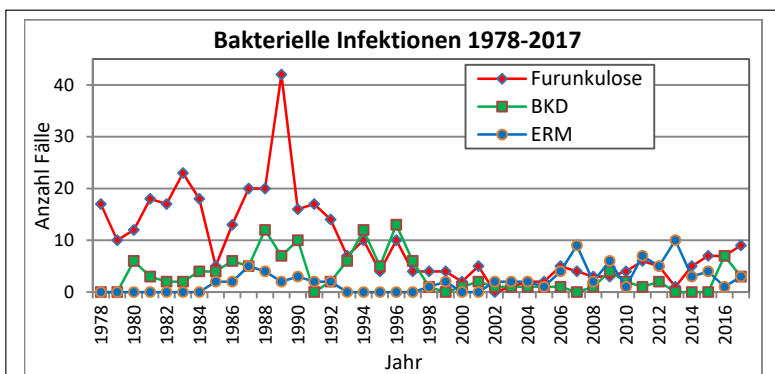


Fig. 2: Entwicklung der Fälle mit bakteriellen Infektionen von 1978-2017.

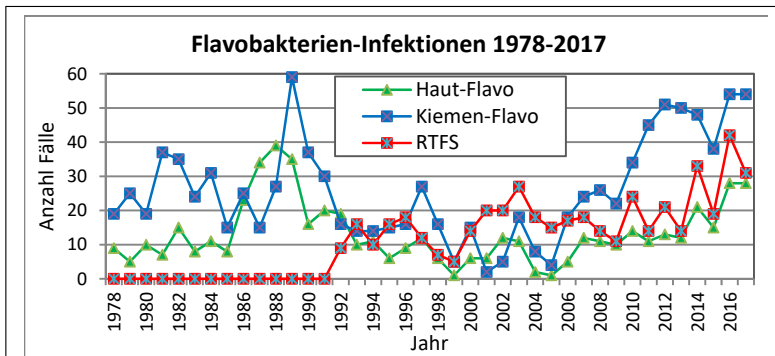


Fig. 3: Entwicklung der Fälle mit Flavobakterien-Infektionen von 1978-2017.

Ichthyophthiriasis und der PKD zeigten sich zwar deutliche Schwankungen der Fallzahlen zwischen den Jahren, aber ein Trend für eine generelle Zu- bzw. Abnahme der Fallzahlen war nicht ersichtlich. Während *Ichthyophthirius multifiliis* und *Ichthyobodo necator* in Fischzuchten zu erheblichen Problemen führen können, ist der PKD-Erreger *T. bryosalmonae* v.a. ein Problem



bei freilebenden Salmoniden. In der Schweiz sind nur wenige Fischzuchten mit PKD-Problemen konfrontiert. Bisher wurde PKD ausschliesslich in Anlagen diagnostiziert, die mit Bachwasser betrieben werden. Ein hoher Anteil der Schweizer Salmonidenzuchten nutzt aber Quell- oder Grundwasser. Dies könnte erklären, weshalb PKD für die Schweizer Salmonidenzucht ein geringeres Problem darstellt als z.B. für Anlagen in England, wo diese Krankheit sehr grosse Schäden verursacht.

Eine Zunahme der Fallzahlen war für *Spironucleus* sp. zu verzeichnen. Dieser Erreger gilt bei Salmoniden als Schwächeparasit, der generell kaum Schäden in Fischzuchten verursacht. Im Hinblick auf die Zunahme der Fälle muss aber die Rolle dieses Parasiten möglicherweise überdacht werden.

Im Verlaufe der Beobachtungsperiode wurden auch vereinzelt neue parasitäre Erreger festgestellt. So wurden 2007 erstmals Amöben bei Forellen in einer Fischzucht nachgewiesen. Weitere Fälle traten von 2011-2013 und 2015 auf. Die Amöbenart wurde bisher nicht bestimmt. Die Infektion führte zu erheblichen Problemen bei den betroffenen Fischpopulationen. Ebenfalls erstmalig in der Schweiz nachgewiesen wurden Scuticociliaten. Bei den betroffenen Tieren handelte es sich um marine Zierfische aus Aquarien.

Die Auswertung der Daten zeigt, dass es in der Periode von 1978 bis 2017 immer wieder zum Auftreten von neuen Krankheiten kam. Interessant ist dabei, dass die neu aufgetretenen Krankheiten zuvor ausnahmslos schon in den die Schweiz umgebenden Ländern diagnostiziert worden waren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Erreger mit importierten Fischen in die Schweiz eingeführt werden. Eine wichtige Rolle spielt aber auch die Neu-Entwicklung oder Etablierung von Methoden, welche es erlaubt, Erreger gezielter nachzuweisen. Damit konnte einerseits erreicht werden, dass Erreger bis auf Artniveau identifiziert werden können (z.B. Mykobakterien), aber auch, dass sie überhaupt erst sicher diagnostizierbar werden (z.B. Scuticociliaten oder der zu den Microspora gehörende Erreger *Pseudoloma neurophilia*).

Die vorgestellten Auswertungen zeigen den Wert der Datenbank für die Verfolgung von neuen Entwicklungen einerseits und weisen andererseits darauf hin, wie interessant aber auch herausfordernd die diagnostische Tätigkeit sein kann. Bei der Interpretation der Daten bezüglich Auftreten von Krankheiten in der Schweiz ist zu berücksichtigen, dass die vorgestellten Resultate ausschliesslich auf Material beruhen, das an die NAFUS eingesandt worden ist und somit nicht zwingend die Realität wiedergibt. Trotzdem sind solche Daten sehr wertvoll, um landesweit Entwicklungen verfolgen. Zudem sind solche Langzeitreihen von Daten in dieser Art weltweit einzigartig.

## Untersuchung verschiedener Fischzelllinien zur Replikation von Cypriniden Herpesvirus-3

Jordan, Lisa K. \* (1); Wicklein, Moritz (1); Christian, Jürgen (2); Rakers, Sebastian (3); Bergmann, Sven M. (4); Becker, Anna M. (1)

1: Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Deutschland; 2: Landesinstitut Tiergesundheit II, Sachgebiet Virologie, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen, Deutschland; 3: AG Aquatische Zelltechnologie, Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB), Lübeck, Deutschland; 4: Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Deutschland

Keywords: Cypriniden Herpesvirus-3, in vitro-Replikation, Common carp brain cells, *Cyprinus carpio* pin cells

### Zusammenfassung

Der Ausbruch der Koi-Herpesinfektion, die durch die Infektion der Fische mit dem Cypriniden Herpesvirus-3 (CyHV-3, auch Koi-Herpesvirus, KHV) verursacht wird, beeinträchtigt Karpfenfarmer weltweit. Um die Viruserkrankung effektiv zu bekämpfen, ist es nötig, die Replikation des Virus näher zu charakterisieren und ein besseres Verständnis des Infektionsprozesses zu gewinnen. Dies ist mittels in vitro-Replikation in Zellkultur möglich, die sich allerdings oft als herausfordernd gestaltet. Eine effiziente Vermehrung von Viruspartikeln in Zellkultur ist deshalb für solche Versuche Voraussetzung.

Das Ziel dieser Studie war es darum, Fischzelllinien zu identifizieren, die hohe Titer an CyHV-3 generieren können. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden acht verschiedene Fischzelllinien, darunter eine neu etablierte Linie (*Cyprinus carpio* pin cells, CCApin, S. Rakers, Fraunhofer EMB), bezüglich der CyHV-3-Replikation verglichen, um festzustellen, mit welchen Zelllinien schon ohne Optimierungsmaßnahmen hohe Titer erreicht werden können. Dafür wurde die Replikation von CyHV-3 in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 9 % fötalem Kälberserum (FKS) und Inkubation bei 25 °C untersucht. Nach Abbruch der Replikation wurde der Virustiter über eine zellkulturbasierte Endverdünnungsmethode (50 % tissue culture infec-

tive dose assay, TCID50) ausgewertet. Für vier überprüfte Zelllinien, darunter die häufig genutzten Common carp brain cells (CCB) und die neu etablierte Zelllinie CCApin, wurden Virustiter  $\geq 10^6$  TCID50/mL detektiert.

Um mit letzterer Zelllinie zuverlässige Replikationsexperimente mit CyHV-3 durchführen zu können, musste sie zunächst bezüglich ihres Kultivierungsverhaltens untersucht werden, um ein stabiles Wachstum der Zellen zur Nutzung in Experimenten sicherzustellen. Zuerst wurden verschiedene Zellkulturmedien (DMEM, Minimum Essential Medium Eagle und Leibovitz's L-15 Medium) getestet, um das schnellste Zellwachstum ( $\mu_{\max}$ ) der Zellen und die höchste erreichbare Zelldichte (in Zellen/cm<sup>2</sup>) in dem Kultivierungssystem zu bestimmen. Mit einer Aussaat Zelldichte von ca.  $8 \cdot 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> und Inkubation bei 25 °C wurde in DMEM mit 15 % FKS- Gehalt das schnellste Zellwachstum mit einer maximal erreichten Zelldichte (ca.  $1,3 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> 10 Tage nach Aussaat) und die höchste Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) von 0,56/Tag erzielt. Es wurde weiterhin getestet, in welchem der Medien das Virus am besten repliziert wird. DMEM erwies sich als vorteilhaft für die Virusreplikation, es wurden Titer von bis zu  $10^7$  TCID50/mL erreicht.

Diese Studie bietet wertvolle Erkenntnisse zur in vitro-Replikation des CyHV-3 in CCApin-Zellen und in weiteren Zelllinien. Dennoch ist weitere Forschung nötig, um die Replikation des Virus näher zu charakterisieren. Mit der neu etablierten und nun gut beschriebenen Zelllinie CCApin entstehen neue Möglichkeiten für solche Untersuchungen mit CyHV-3. Außerdem können die gewonnenen Ergebnisse auch genutzt werden, um Verbesserungen zellkulturbasierter CyHV-3-Diagnostik und verschiedener Impfstoffkonzepte zu erreichen.

Diese Arbeit wird finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), FKZ: 2815HS010.

## **Hypnos trifft Thanatos: Infektionen von Karpfen mit dem Carp Edema Virus und die Schlafkrankheit der Karpfen**

Dieter Steinhagen, Mikolaj Adamek, Verena Jung-Schroers, Max Heiling, Felix Teitge

Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Parasitologie, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Bünteweg 17, 30559 Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung:**

In Karpfen- und Koibeständen sorgt ein Krankheitsgeschehen, das mit lethargischem Verhalten der betroffenen Fische und ödematösen Veränderungen an Haut und Kiemen einhergeht, für Morbidität und zum Teil hohen Verlusten. Die aufgrund des klinischen Bildes als „Koi Sleepy Disease“ (KSD) bezeichnete Erkrankung wird vermutlich durch ein Pockenvirus hervorgerufen, das aufgrund der bei den infizierten Fischen zu beobachtenden ödematösen Veränderungen der Kiemen als Carp Edema Virus (CEV) bezeichnet wird.

Pathophysiologische Untersuchungen ergaben, dass Koi mit KSD Sauerstoffmangel erlitten, diesen aber durch Anpassung des Stoffwechsels kompensieren konnten. Schwerwiegender stellten sich der ebenfalls erlittene Salzverlust und ein dramatischer Anstieg des Ammoniakspiegels im Blut dar. Das komatöse Verhalten klinisch erkrankter Koi könnte auf eine toxische Wirkung des Ammoniaks sowie auf die Hyponatriämie zurückzuführen sein. Dies wurde experimentell durch Aufsalzen des Wassers bestätigt. Dann blieben klinische Symptome aus, die Virusvermehrung war aber nicht beeinträchtigt. Die Erforschung von CEV-Infektionen ermöglicht, komplexe Mechanismen von Entstehung und Entwicklung von Erkrankungen bei Fischen zu untersuchen.

### **Summary:**

A disease, which is accompanied with lethargic behaviour and edematic alterations of gills and skin, may cause morbidity and mortality in populations of carp and ornamental koi. Because of the characteristic behaviour of affected fish, the disease was named “Koi sleepy disease, KSD”. KSD is most likely caused by an infection of affected fish with a poxvirus which is named Carp Edema Virus (CEV) according to proliferative gill changes observed in

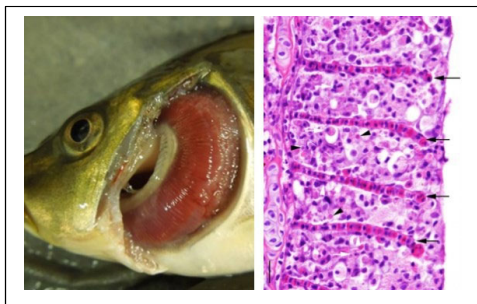
infected fish.

Investigations into the pathophysiology of KSD affected fish revealed that these fish experienced oxygen shortage, but this could be balanced by adjustments of the metabolism. More serious were a dramatic reduction of the sodium level and a severe increase of the ammonium concentration, which occurred in parallel in the blood of affected koi. The comatose state in KSD affected koi could be related to toxic actions of the increased ammonia and the reduced sodium levels. This assumption was supported by observation during a CEV infection experiment with salt supplementation to the aquarium water. Then clinical KSD was not observed in the CEV infected Koi kept in salt supplemented water, even though CEV replication was not affected by the salt supplementation. Investigations into CEV infection of carp enable studying the complex interplay of host and pathogen during this branchial disease in fish.

Seit den 1970-er Jahren wird in Japan ein Krankheitsgeschehen bei Koi beobachtet, das mit ödematösen Veränderungen an Haut und Kiemen sowie mit hohen Verlusten einhergeht. Betroffene Fische zeigen ein lethargisches Verhalten und liegen oft auf einer Körperseite wie schlafend auf dem Grund des Teiches, was der Erkrankung den Trivialnamen „Koi Sleepy Disease“ (KSD) einbrachte. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Kiemen betroffener Individuen wurden einem Pockenvirus ähnliche Viruspartikel nachgewiesen und in späteren molekularbiologischen Untersuchungen konnte eine Nukleotidsequenz identifiziert werden, die große Ähnlichkeit mit der Nukleotidsequenz eines Gens aufweist, das ein für Pockenviren charakteristisches Protein, das p4a Protein codiert. Das Virus wurde aufgrund der bei infizierten Karpfen beobachteten pathologischen Veränderungen an den Kiemen als Carp Edema Virus (CEV) bezeichnet. Im Jahr 2012 wurde diese Nukleotidsequenz erstmals bei Speisekarpfen in Europa nachgewiesen, die ebenfalls eine proliferative Kiemenerkrankung und für die KSD charakteristische Verhaltensänderungen aufwiesen. In der Folge wurden gleiche Genomsequenzen in den Kiemen erkrankter Karpfen aus verschiedenen europäischen Ländern nachgewiesen, so dass von einer weiten Verbreitung des Virus und der KSD in Karpfenbeständen in Europa ausgegangen werden kann. Da klinische KSD vor allem im Frühjahr oder im Herbst bei kühlen Wassertemperaturen auftritt, besteht die Vermutung, dass Infektionen mit CEV und KSD für die seit langem in einigen Karpfenbeständen beobachtete, bisher unerklärliche Frühjahrssterblichkeit verantwortlich sein könnten. Die

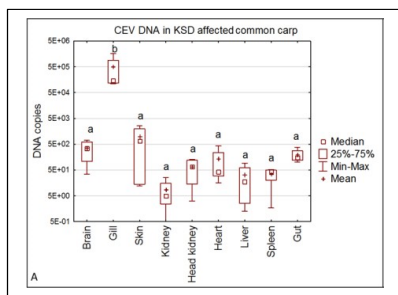
Analyse der bei verschiedenen Ausbrüchen isolierten Nukleotidsequenzen des Virus zeigte, dass in Europa zwei Varianten des Virus zu finden sind: eine Variante, Viren der Genogruppe I, wurde in Karpfen gefunden und Viren der Genogruppe IIa fast ausschließlich in Koi. Auch Isolate aus Asien (Japan, China, Indien, Korea) sind der Genogruppe IIa zuzuordnen. Deshalb wird vermutet, dass Isolate der Genogruppe I für CEV aus Karpfen in Europa charakteristisch ist und Isolate der Genogruppe IIa für Infektionen bei Koi und Karpfen in Asien.

Viren beider Genogruppen wurden in Kiemenproben nachgewiesen, die über mehrere Jahre und aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands gesammelt wurden, wobei Koi mit CEV der Genogruppe IIa und Karpfen mit CEV der



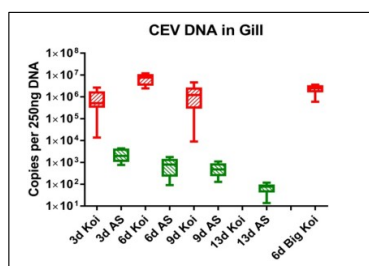
**Abbildung 1:** An Koi Sleepy Disease erkrankter Karpfen mit einer Schwellung der Kiemenlamellen (links) und proliferativen Veränderung des Kiementgewebes mit einer Auffüllung des interlamellären Spaltes mit proliferierenden und nekrotisierenden Zellen (rechtes Bild).

Genogruppe I infiziert waren. Infektionsversuche bestätigten, dass Viren aus beiden Genogruppen bei infizierten Fischen Symptome der KSD und Todesfälle hervorrufen können. Das Virus infiziert in erster Linie das Kiementgewebe von Fischen. Hier waren sehr hohe Viruslasten und eine hohe Virusvermehrung zu beobachten, während in Darm, Gehirn, Haut, Herz, Leber, Milz, Niere und Kopfniere keine Infektion oder nur eine geringe Viruslast gemessen wurden.



**Abbildung 2:** CEV Abundanz in verschiedenen Geweben von Koi mit klinischer KSD. Die Abundanz von CEV-spezifischer DNA wurde mittels quantitativer PCR ermittelt und auf 250 ng isolierter DNA berechnet. N= 4 Koi.

Die Virulenz unterschiedlicher Virusisolate sowie die Empfänglichkeit verschiedener Karpfenlinien für eine Infektion mit CEV wiesen erhebliche Unterschiede auf. CEV-Isolate der Genogruppe I führten sowohl bei Koi als auch bei einigen Karpfenherkünften zu klinischer Erkrankung und zu Todesfällen, CEV-Isolate der Genogruppe IIa lösten lediglich bei Koi eine klinisch apparente Erkrankung aus. CEV-Isolate der Genogruppe IIa infizierten zwar Karpfen verschiedener Herkünfte, die Karpfen konnten aber die Infektion eliminieren, ohne dass klinische Symptome erkennbar wurden. Zur Aufklärung der Ursachen für die klinischen Symptome der KSD, insbesondere das lethargische Verhalten betroffener Fische und das Liegen auf dem Grund des Gewässers, wurden Koi und Karpfen mit CEV der Genogruppe IIa infiziert und 3, 6 und 9 Tagen nach der Infektion wurden von infizierten und nicht infizierten Fischen Blutproben entnommen.



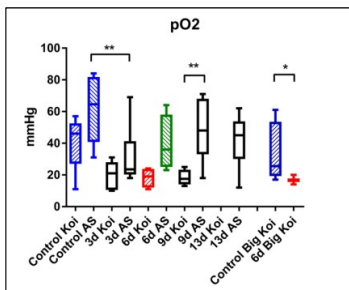
**Abbildung 3:** CEV-Abundanz in Kiemen von Karpfen und Koi nach experimenteller Infektion mit CEV der Genogruppe IIa. Dargestellt ist die Anzahl CEV-spezifischer DNA-Kopien pro 250 ng isolierter DNA von n= 6 Fischen. Koi: Koi-Karpfen, AS: Amur-Schuppenkarpfen. 6 und 9 Tage nach der Infektion litten Koi unter klinischer KSD.

Bereits 3 Tage nach der Infektion waren in den Kiemen infizierter Koi ca.  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Kopien CEV-spezifischer DNA nachweisbar und die Viruslast stieg zum 6. Tag nach der Infektion auf bis zu  $10^7$  Kopien CEV spezifischer DNA an. An diesem Tag wurden bei einigen Koi für KSD charakteristische klinische Symptome beobachtet. Eine vergleichbare Viruslast und



Krankheitssymptome der KSD wurden auch bei Koi am 9. Tag nach Infektion festgestellt.

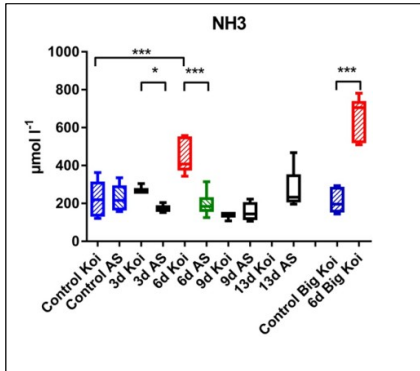
Aufgrund der bei erkrankten Fischen auftretenden proliferativen Kiemenveränderungen wurde vermutet, dass Koi mit klinischer KSD einen Sauerstoffmangel erlitten. In den Blutproben der klinisch erkrankten Koi wurde tatsächlich ein im Vergleich zu nicht infizierten Koi und zu nicht erkrankten Karpfen signifikant erniedrigter Sauerstoffgehalt gemessen. Eine Untersuchung der im Blutserum vorliegenden Metaboliten ergab eine signifikante Abnahme von Metaboliten des Nucleotidstoffwechsels, was auf ein reduziertes Wachstum der Fische unter Sauerstoffmangel schließen lässt. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Metaboliten des Zitronensäure-Zyklus und eine erhöhte Konzentration von Glucose-6-phosphat, einem Metaboliten aus der Glykogenolyse festgestellt, was darauf hindeutet, dass Koi mit klinischer KSD unter Umgehung des von Sauerstoff abhängigen Zitronensäurezyklus vermehrt Energie aus dem Abbau von Glykogen gewinnen und so der geringeren Verfügbarkeit von Sauerstoff begegnen. Die weitere Untersuchung von Blutparametern offenbarte bei an KSD erkrankten Koi signifikant erhöhte Ammoniakspiegel im Blutplasma. Gleichzeitig zeigte ein erhöhter Spiegel von Ornithin und Harnstoff im Blutplasma eine gesteigerte Harnstoff-Synthese bei Koi mit KSD an. Ebenso wurden erhöhte Spiegel der Aminosäuren beta-Alanin, L-Cystein, L-Serin und L-Valin beobachtet.



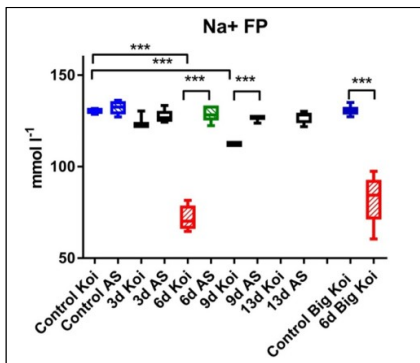
**Abbildung 4:** Sauerstoffgehalte im Blut von Karpfen und Koi nach Infektion mit CEV. Koi am Tag 6 und 9 nach der Infektion litten unter klinischer KSD. Dargestellt sind Messwerte von n=6 Fischen. Koi: Koi-Karpfen, AS: Amur-Schuppenkarpfen.

Vergleichbare Reaktionen sind von Fischen bekannt, die zeitweilige Ausflüge an Land unternehmen und dabei kein Ammoniak über die Kiemen ausscheiden können. Diese Beobachtung lässt somit vermuten, dass bei Koi mit KSD die Ausscheidung von Ammoniak über die pathologisch veränderten Kiemen behindert ist und darauf die beobachteten Veränderungen des Stoffwechsels zurückzuführen sind. Erhöhte Ammoniakspiegel können bei Wir-

beltieren Koma auslösen, so dass die erhöhten Ammoniakspiegel als Erklärung für die Verhaltensänderungen der Koi unter KSD dienen könnten.



**Abbildung 5:** Ammoniak-Spiegel im Blut von Karpfen und Koi nach Infektion mit CEV. Koi am Tag 6 und 9 nach der Infektion litten unter klinischer KSD. Dargestellt sind Messwerte von n=6 Fischen. Koi: Koi-Karpfen, AS: Amur-Schuppenkarpfen.



**Abbildung 6:** Natrium-Spiegel im Blut von Karpfen und Koi nach Infektion mit CEV. Koi am Tag 6 und 9 nach der Infektion litten unter klinischer KSD. Dargestellt sind Messwerte von n=6 Fischen. Koi: Koi-Karpfen, AS: Amur-Schuppen-karpfen.

Die Untersuchung des Blutplasmas offenbarte darüber hinaus dramatisch einen erniedrigten Natriumspiegel und einen signifikant niedrigeren Calciumspiegel im Blut der an KSD erkrankten Koi. Der Natriumspiegel war von im Mittel 140 mmol bei nicht infizierten Fischen auf unter 100 mmol bei Koi mit KSD abgesunken, was als lebensbedrohende Störung des Salzhaushaltes interpretiert werden kann. Gleichzeitig wurde bei den an KSD erkrankten Koi eine Zunahme des Gehirngewichtes festgestellt, was auf das Eindringen von Wasser in das Gehirn in Folge des gestörten Elektrolythaushaltes interpretiert werden kann und zu den komatösen Verhaltensänderungen beitragen kann. Dass die Störung des Salzhaushaltes für Koi mit KSD lebensbedrohend ist, wurde in einem nachfolgenden Experiment deutlich. Entsprechend der

Empfehlung von japanischen Fischpathologen an Koizüchter, deren Fische von der KSD betroffen sind, dem Haltungswasser Kochsalz zuzusetzen, wurden Koi zunächst mit CEV infiziert und dann wurde eine Gruppe dieser Fische in einem Becken gehalten, in dem dem Wasser 0,6 % NaCl zugesetzt wurde. Während Koi im Becken ohne Zusatz von Kochsalz im Verlauf von 6 Tagen eine klinische KSD entwickelten, traten bei den Koi im Becken mit Kochsalz keine Krankheitssymptome auf. In den Kiemen der Koi aus beiden Becken wurden 6 Tage nach der Infektion eine vergleichbar hohe Viruslast gefunden – die Vermehrung des CEV blieb demnach vom Kochsalzzusatz zum Wasser weitgehend unberührt. Der Sauerstoffgehalt im Blut der Fische aus dem Becken mit Kochsalz entsprach dem Sauerstoffgehalt im Blut nicht infizierter Koi, während das Blut der Fische aus dem Becken ohne Kochsalz eine geringere Sauerstoffkonzentration aufwies. Ebenso entsprachen der Ammoniak-Gehalt und der Natriumspiegel im Blut der mit CEV infizierten Koi aus dem Becken mit Kochsalzzusatz dem Spiegel der nicht infizierten Kontrollfische, während bei CEV infizierten Fischen aus dem Becken ohne Kochsalzzusatz der Natriumspiegel signifikant abgesenkt und der Ammoniakspiegel deutlich erhöht waren.

Die Kiemen von Fischen stehen über eine große Oberfläche in engem Kontakt mit dem umgebenden Wasser und sind deshalb der Ort von zahlreichen Austauschprozessen zwischen Wasser und Blut. Neben den Aufgaben der Respiration, dem Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid, erfolgt hier und nicht in der Niere die Exkretion von Ammoniak aus dem Blut. Außerdem spielen Kiemen in der Regulation des Salzhaushaltes eine wichtige Rolle. Kiemen übernehmen somit im Stoffwechsel der Fische neben der Funktion als Atemorgan wichtige Aufgaben, die im Stoffwechsel von terrestrischen Tieren zu den Funktionen der Niere gehören. Die Untersuchungen an Koi mit KSD zeigen deutlich, dass eine Schädigung der Kiemen eine weitreichende Beeinträchtigung der Homöostase der betroffenen Fische verursacht. Dabei bewirkt, wie die Experimente mit dem Zusatz von Kochsalz zum Haltungswasser zeigen, die Störung des Elektrolythaushaltes, die stärkste Schädigung des internen Milieus der Fische.

## Die Diagnostik des “carp edema virus (CEV)” in Deutschland

Bergmann, Sven M.

Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel  
Riems, Deutschland

### Zusammenfassung

Seit 2013 verbreitete sich eine neue Erkrankung der Karpfen und Kois (*Cyprinus carpio* L.), welche in einem Zusammenhang mit dem seit den 70-iger Jahren in Japan diagnostizierten „carp edema virus (CEV)“ zu stehen scheint und die „koi sleepy disease (KSD)“ auslöst. Ursprünglich beim Karpfen nachgewiesen, infizierte das CEV sehr schnell die Kois. Mit diesen wurde das Virus offenbar weltweit verbreitet. Die klinischen Zeichen konnten teilweise nicht von der der Koi-Herpesvirus-Infektion (KHV-I) unterschieden werden: starkes Abschleimen, später Sandpapierhaut und eingefallene Augen. Gegenwärtig steht das CEV in Verdacht, auch maßgeblich für die „Frühjahrssterblichkeit der Karpfen“ verantwortlich zu sein.

Zur länderübergreifenden Diagnostik dieser nicht anzeigepflichtigen, aber dennoch schwerwiegenden Erkrankung der Karpfen und Kois, erwies es sich als notwendig, das Verfahren für die Diagnostik des CEV zu standardisieren. Dies sollte zur Vergleichbarkeit der gefundenen positiven Ergebnisse beitragen. Zu diesem Zweck initiierten M. Adamek (TiHo Hannover) und Frau N. Scuda (LGL Bayern) einen internen Laborvergleich zum Nachweis des CEV aus 12 Proben. Den 10 Teilnehmern standen dabei die konventionelle PCR und nested PCR mit der Sequenzanalyse der Fragmente als auch die qPCR zur Verfügung. Alle diese Verfahren waren im CEFAS in England entwickelt worden, da sich die PCRs aus Japan immer weniger zum Nachweis des CEV in Europa eigneten. Das Virus scheint sich, wie schon das KHV, an europäische Umweltbedingungen auch genetisch angepasst zu haben.

Im Ergebnis der Überprüfung konnte gezeigt werden, dass sich die CEV-qPCR sehr gut für die Beurteilung von Beständen als auch bei hohen und mittleren Viruslasten bei Einzeltieren eignet. Für eine exakte Diagnostik des Einzeltiers, speziell bei geringen Viruslasten in den Proben, kann die PCR mit anschließender nested PCR empfohlen werden. Von Vorteil ist es dabei, die Sequenzanalyse der Fragmente durchzuführen, da mittlerweile mindestens 3 genotypische Varianten des CEV in Europa bekannt sind.

## Epidemiologische Untersuchungen zum Auftreten und zur Pathogenität vom Carp Edema Virus (CEV) in Fischen in Deutschland

Verena Jung-Schroers<sup>1\*</sup>, Max Heling<sup>1</sup>, Mikolaj Adamek<sup>1</sup>, Felix Teitge<sup>1</sup>, Julia Bauer<sup>1</sup>,

Dirk W Kleingeld<sup>2</sup>, Alice Welzel<sup>2</sup>, Sven M Bergmann<sup>3</sup>, Carola Sauter-Louis<sup>3</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezernat 32, Task-Force Veterinärwesen, Hannover, Deutschland

<sup>3</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Infektionsmedizin, Greifswald - Insel Riems, Deutschland

### Zusammenfassung:

Die Schlafkrankheit der Koi, die sogenannte Koi Sleepy Disease (KSD), wird durch Infektionen mit dem Carp Edema Virus (CEV) verursacht. In den Jahren 2015 und 2016 wurde eine epidemiologische Studie zum Auftreten von CEV-Infektionen bei Fischen in Deutschland durchgeführt. In 248 Proben konnten CEV-Genomfragmente nachgewiesen werden. Die meisten Nachweise, insgesamt 179, erfolgten in Proben von Koi (*Cyprinus carpio*), in 61 Proben von Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurde das CEV-Genomfragment gefunden und in jeweils 1-2 Proben von Flussbarschen (*Perca fluviatilis*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*), Hechten (*Esox lucius*), Kaulbarschen (*Gymnocephalus cernua*) und Zandern (*Sander lucioperca*) wurde das CEV-Genomfragment in geringen Mengen ( $1.10E+00 - 1.19E+03$ ) nachgewiesen. Die höchsten Viruskonzentrationen waren in Proben von Koi ( $1.00E+00 - 4.82E+06$ ) und von Karpfen ( $1.00E+00 - 4.03E+06$ ) vorhanden. Charakteristische Symptome für eine KSD waren Enophthalmus, Anorexie, Kiemennekrose, Kiemenschwellung und Lethargie. Am häufigsten wurde das CEV im Frühling und im Frühsommer nachgewiesen. In Koi traten Krankheitsausbrüche aufgrund einer CEV-Infektion hauptsächlich bei Wassertemperaturen zwischen 17 und 18°C auf, während die Wassertemperaturen bei einem Krankheitsausbruch bei Karpfen in den meisten Fällen zwischen 9 und 13°C lagen.

In 46,66 % der Proben von klinisch gesunden Kois und Karpfen aus Handelsbetrieben wurden CEV-Genomfrequenzen nachgewiesen. Auch in klinisch gesunden Koi und Karpfen anderer Herkunft wurden zum Teil CEV-Genfragmente

gefunden, allerdings bezogen auf alle untersuchten Proben nur in 26,32% der Proben. In infizierten Speisekarpfen wurden häufiger Krankheitssymptome und höhere Mortalitätsraten beobachtet, als in infizierten Koi. Aufgrund der erhobenen Projektergebnisse sollte eine künftige Meldepflicht der KSD weiterhin in Erwägung gezogen werden.

#### Summary:

Koi Sleepy disease (KSD) is caused by infections with the Carp Edema Virus (CEV). In 2015 and 2016, an epidemiological study on the occurrence of CEV infections in fish was conducted in Germany. CEV genome fragments were detected in 248 samples. In 179 from koi (*Cyprinus carpio*) and in 61 samples of carp (*Cyprinus carpio*) CEV genome fragments were detected. Additionally in 1-2 samples of perch (*Perca fluviatilis*), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), pike (*Esox lucius*), ruff (*Gymnocephalus cernua*) and zander (*Sander lucioperca*), CEV genome fragments were detected in small amounts ( $1.10E + 00$  -  $1.19E + 03$ ). The highest virus concentrations were found in samples of koi ( $1.00E + 00$  -  $4.82E + 06$ ) and carp ( $1.00E + 00$  -  $4.03E + 06$ ). Typical symptoms of KSD were enophthalmos, anorexia, gill necrosis, gill swelling and lethargy. Most frequently, CEV was detected in spring and early summer. In koi, disease outbreaks due to CEV infection occurred mainly at water temperatures between 17 and 18° C, while water temperatures in disease outbreaks in carp were in most cases between 9 and 13° C.

In 46.66% of samples from clinically healthy koi and carp from wholesalers, CEV genome fragments were detected. Also in clinically healthy koi and carp of other origins, some CEV genome fragments were found, but only in 26.32% of the samples. Infected carp showed more often signs of a disease and higher mortality rates than infected koi. Based on the results of the project, it should be considered whether positive PCR-results should be reported to the local veterinary office.

Die Schlafkrankheit der Koi („Koi Sleepy Disease“, KSD) wurde erstmals 1974 bei Koi in Japan beschrieben. Bei den betroffenen Fischen wurden ödematöse Veränderungen der Haut und der Kiemen, ein lethargisches Verhalten, Kiemenschwellungen und -nekrosen, Enophthalmus und Hautläsionen beobachtet. Ursache der Erkrankung ist ein Pockenvirus, das Carp Edema Virus (CEV). In den letzten Jahren wurden CEV-Genomfragmente bei Koi und Karpfen aus verschiedenen europäischen und nicht-europäischen Ländern nachgewiesen. Inzwischen wird von einer weiten Verbreitung des Virus und der KSD in Karpfenbeständen

in Europa ausgegangen. Da die Erkrankung insbesondere bei kühlen Wassertemperaturen im Frühjahr und im Herbst auftritt, besteht die Vermutung, dass CEV-Infektionen für die in Karpfenbeständen bisher unerklärliche Frühjahrssterblichkeit verantwortlich sein könnten. Die Analyse der bei verschiedenen Ausbrüchen isolierten Nukleotidsequenzen des Virus zeigte, dass mindestens zwei Varianten des Virus zu finden sind. Der Genotyp I wird in Deutschland und auch in anderen europäischen Ländern hauptsächlich bei Karpfen nachgewiesen und stellt demnach wahrscheinlich eine europäische Variante dar. Der Genotyp IIa wird hauptsächlich in Koi in Europa aber auch in Karpfen und Koi aus Asien nachgewiesen und stellt demnach vermutlich eine asiatische Variante des Virus dar.

Insgesamt wurden 651 Proben, die aus allen Bundesländern Deutschlands stammten, untersucht. Die Proben stammten von Fischen aus privaten Teichhaltungen, Teichwirtschaften, sowie aus dem Einzel- und Großhandel. Ein Nachweis von CEV-Genom-Sequenzen konnte in 248 Proben der untersuchten Proben erbracht werden. Insgesamt wurden 13 Fischarten untersucht (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Untersuchte Fischarten, Anzahl der positiv getesteten Fische und Viruslasten im Kiemengewebe der positiv getesteten Fische.

| Fischarten                                      | Anzahl untersuchte Fische | Anzahl positiv getestete Fische | Viruslast          |
|---|---------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Bitterling ( <i>Rhodeus sp.</i> )               | 1                         | 0                               |                    |
| Wuppelkarpfen ( <i>Myxocyprinus asiaticus</i> ) | 2                         | 0                               |                    |
| Karpfen ( <i>Cyprinus carpio</i> )              | 131                       | 62                              | 1,00E+00-4,03E+06  |
| Rotfeder ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) | 1                         | 0                               |                    |
| Kaulbarsch ( <i>Gymnocephalus cernua</i> )      | 1                         | 1                               | 1,66E+01           |
| Flussbarsch ( <i>Perca fluviatilis</i> )        | 5                         | 2                               | 3,14E+00-1,06E+01  |
| Goldfisch ( <i>Carassius auratus</i> )          | 11                        | 0                               |                    |
| Graskarpfen ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )  | 11                        | 1                               | 4,28E+00           |
| Orfe ( <i>Leuciscus idus</i> )                  | 1                         | 0                               |                    |
| Koi ( <i>Cyprinus carpio</i> )                  | 480                       | 179                             | 1,00E+00- 4,82E+06 |
| Hecht ( <i>Esox lucius</i> )                    | 3                         | 2                               | 1,10E+00-6,52E+01  |
| Schleie ( <i>Tinca tinca</i> )                  | 3                         | 0                               |                    |
| Zander ( <i>Sander lucioperca</i> )             | 1                         | 1                               | 1,19E+03           |

In sieben der untersuchten Fischarten konnten CEV-Genomsegmente nachgewiesen werden, wobei die meisten Nachweise bei Koi und Karpfen erbracht wurden. In Einzelfällen konnten auch Genomsequenzen des CEV bei Fischarten, die zusammen mit Koi oder Karpfen gehalten worden waren, detektiert werden.



Bei diesen Arten handelte es sich um Flussbarsche (*Perca fluviatilis*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*), Hechte (*Esox lucius*), Kaulbarsche (*Gymnocephalus cernua*) und Zander (*Sander lucioperca*). Hohe Viruslasten konnten nur bei Koi ( $1.00\text{E}+00 - 4.82\text{E}+06$ ) und Karpfen ( $1.00\text{E}+00 - 4.03\text{E}+06$ ) gefunden werden, während bei den anderen Fischarten das CEV-Genomfragment nur in geringen Mengen ( $1.10\text{E}+00 - 1.19\text{E}+03$ ) nachgewiesen werden konnte.

Charakteristische Symptome für eine KSD waren nach statistischer Analyse nur Enophthalmus, Anorexie, Kiemennekrose, Kiemenschwellung und Lethargie. Das Liegen am Grund, Exophthalmus, Hautveränderungen und Ödeme konnten nicht statistisch häufiger bei mit CEV infizierten Fischen nachgewiesen werden als bei nicht infizierten Tieren.

Am häufigsten wurde das CEV im Frühling und im Frühsommer, insbesondere in den Monaten April bis Juli, nachgewiesen. In Koi traten Krankheitsausbrüche aufgrund einer CEV-Infektion hauptsächlich bei Wassertemperaturen zwischen 17 und 18°C auf, während die Wassertemperaturen bei einem Krankheitsausbruch bei Karpfen in den meisten Fällen zwischen 9 und 13°C lagen.

Ein Nachweis von CEV Genomfragmenten war auch in Proben klinisch gesunder Fische möglich. In 46.66% aller untersuchten Proben von klinisch unauffälligen Koi aus Beständen von Großhändlern wurden CEV-Genomfragmente nachgewiesen. Die Prävalenz für CEV in allen untersuchten Proben von klinisch gesunden Kois und Karpfen lag bei 26.32 %. Der Handel von Koi scheint demnach eine Rolle in der Verbreitung durch den Verkauf symptomloser Virus-träger zu spielen.

In infizierten Speisekarpfen wurden häufiger Krankheitssymptome und höhere Mortalitätsraten beobachtet, als in infizierten Koi.

Aufgrund der erhobenen Projektergebnisse sollte eine künftige Meldepflicht der KSD weiterhin in Erwägung gezogen werden.

## Erster bestätigter Nachweis des Salmonid Alphavirus in Österreich und beim Eismeersaibling (*Salvelinus alpinus*)

Lewisch, Eva\* (1); Frank, Tamara (2); Soliman, Hatem (1); Schachner, Oskar (1); Friedl, Adina (1); El-Matbouli, Mansour (1)

- 1: Klinische Abteilung für Fischmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich  
2: Fischpraxis Frank, Waidach 8a, 5151 Nussdorf am Haunsberg, Österreich

### Zusammenfassung:

Die Schlafkrankheit der Salmoniden (sleeping disease, SD) wird durch das Salmonid Alphavirus 2 (SAV 2) verursacht und wurde bisher bei in Frischwasser gehaltenen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Atlantischem Lachs (*Salmo salar*) nachgewiesen. Wir berichten von dem ersten bestätigten Auftreten der SD bei Eismeersaiblingen (*Salvelinus alpinus*) in Aquakultur und in Österreich. Zur Untersuchung gelangten 12 Eismeersaiblinge aus einem Bestand mit für die Krankheit verdächtigem Verlauf und Symptomen. Drei Monate nach Krankheitsausbruch und zum Zeitpunkt der Untersuchungen hatte die kumulative Mortalität 18% erreicht. Die histopathologische Untersuchung zeigte nekrotische Herde in der roten und weißen Skelettmuskulatur, dem Herzmuskel und dem Pankreas. Veränderungen in der Niere waren möglicherweise die Folge einer eingeschränkten Herzfunktion. Für die Zellkultur wurden die Zellreihen Epithelioma papillosum cypriini (EPC), Bluegill fry (BF-2) und Chinook salmon embryo (CHSE-214) verwendet. In CHSE-214 Zellen wurde während der ersten Passagen ein cytopathogener Effekt (CPE) beobachtet, der jedoch in weiteren Subkulturen nicht wiederholbar war. Die Untersuchung mittels real-time RT-PCR zum Nachweis des nsP3 Gens des SAV war in 11 von 12 Proben positiv. Die Amplifikation dieser Sequenz mittels konventioneller RT-PCR ermöglichte eine Sequenzierung und die Erstellung eines phylogenetischen Baumes. Das nachgewiesene Fragment konnte so dem Genotyp SAV2 zugeordnet werden

Ref: Lewisch E, Frank T, Soliman H, Schachner O, Friedl A, El-Matbouli M (2018) First confirmation of salmonid alphavirus infection in Arctic char *Salvelinus alpinus* and in Austria. Dis Aquat Org 130:71-76. <https://doi.org/10.3354/dao03265>

Formatiert: Englisch (Vereinigtes Königreich)

## Koinfektionen mit Piscine orthoreovirus 1 und 3 in Salmoniden mit Furunkulose in Deutschland

Adamek, Mikolaj (1); Hellmann, John (2); Flamm, Agnes (3); Teitge, Felix (1); Vendramin, Niccolò (4); Fey, Daniel (2); Riße, Karin (3); Blakey, Franziska (3); Rimstad, Espen (5); Steinhagen, Dieter (1)

- 1: Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;
- 2: Fischereiökologie, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen;
- 3: Fachgebiet Tiergesundheitsdienste, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor Giessen;
- 4: Aquatic Animal Health Group, DTU AQUA, National Institute of Aquatic Resources, Technical University of Denmark;
- 5: Department of Food Safety and Infection Biology, Norwegian University of Life Sciences

### Zusammenfassung

Piscine-Orthoreoviren (PRVs) sind neu auftretende virale Pathogene, die bei Salmoniden Durchblutungsstörungen verursachen. PRV-1 ist die ätiologische Ursache der Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) bei gezüchtetem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*). Die Erkrankung ist charakterisiert durch Epikarditis, Entzündung und Nekrose des Myokards, Myositis und Nekrose des roten Skelettmuskels. Das kürzlich entdeckte PRV-3 (auch PRV-Om genannt) induziert eine HSMI-ähnliche Erkrankung bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Zwei deutsche Zuchtbetriebe, die Atlantischen Lachs bzw. Regenbogenforellen züchten, erlebten im Jahr 2017 einen Krankheitsausbruch mit einer kumulierten Mortalität von 10% bzw. 20%. Die wichtigsten klinischen Symptome bei den erkrankten Fischen waren Erschöpfung und Lethargie. Die virologische Untersuchung ergab eine PRV-1-Infektion bei den Atlantischen Lachsen und eine PRV-3-Infektion bei den Regenbogenforellen. In weiteren Untersuchungen wurde auch *Aeromonas salmonicida* in den inneren Geweben beider Spezies nachgewiesen. Während PRV-1 höchstwahrscheinlich der Auslöser der Erkrankung der Atlantischen Lachse war, litt der Großteil der Regenbogenforellen auch an einer systemischen Infektion mit *A. salmonicida*. Interessanterweise war das deutsche PRV-3-Isolat genetisch enger mit einem chilenischen PRV-3-Isolat aus dem Coho-Lachs (*Oncorhynchus kisutch*) verwandt als mit dem Isolat aus dem

Erstnachweis von PRV-3 aus Regenbogenforellen in Norwegen. Die Ergebnisse aus Deutschland bestätigen eine breite geografische Verbreitung beider Viren und legen deren Ausbreitung durch den weltweiten Handel mit lebenden Salmoniden nahe. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Krankheiten, die durch PRVs induziert werden, bei der Untersuchung von Mortalitäten in Salmonidenbeständen mitberücksichtigt werden sollten

## ***Flavobacterium branchiophilum* als sekundärer Erreger bei koi sleepy disease**

Adamek, Mikolaj\* (1); Teitge, Felix (1); Jung-Schroers, Verena (1); Heiling, Max (1); Gela, David (2); Piackova,

Veronika (2); Kocour, Martin (2); Steinhagen, Dieter (1)

1: Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;

2: South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

### **Zusammenfassung**

Die koi sleepy disease (KSD) verläuft oft tödlich und führt zu einer starken Beeinträchtigung von Karpfen. Daher ist die KSD von zunehmender Bedeutung für die globale Aquakultur. Trotz der Tatsache, dass das carp edema virus (CEV) höchstwahrscheinlich der Erreger der KSD ist, scheint sich die Krankheit häufig als multifaktoriell zu präsentieren. Mehrere Parasiten und Bakterienarten sind auf Kiemen, Haut oder in inneren Organen von Fischen, die an klinischer KSD leiden, vorhanden. In dieser Studie haben wir eine mögliche Interaktion von Flavobakterien und CEV-Infektionen in der Entwicklung von klinischer KSD bei Karpfen mit einer proliferativen Kiemenkrankung analysiert. Wir untersuchten ausgewählte Feldproben aus Deutschland und Ungarn und konnten das Vorhandensein von CEV- und Flavobakterien-Koinfektionen in einigen Proben feststellen. Um zu bestätigen, dass Flavobakterien als Koinfektionen bei CEV auftreten, wurden mehrere Infektionsexperimente durchgeführt, in denen die Übertragung beider Infektionserreger und die Dynamik der beiden Infektionen untersucht wurde. Wir analysierten, welche Flavobakterien-Arten von Fischen die von KSD-betroffenen waren, isoliert / identifiziert werden konnten und schlossen daraus, dass *Flavobacterium branchiophilum* ein mögliches Ko-Pathogen von CEV bei an KSD erkrankten Fischen ist. Untersuchungen mit einer Antibiotikabehandlung von Karpfen und Studien an Fischen aus Karpfenstämmen mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für KSD ergaben, dass CEV der primäre Krankheitserreger zu sein scheint, der eine Schädigung der Kiemen von Karpfen verursacht und dadurch anderen Pathogenen, einschließlich *F. branchiophilum*, ermöglicht, Koinfektionen zu etablieren. Trotz der Tatsache, dass eine Koinfektion von *F. branchiophilum* für die Entwicklung des klinischen Bildes der KSD nicht erforderlich ist, könnte das Bakterium zu den

pathologischen Veränderungen beitragen, die während des Ausbruchs dieser Krankheit beobachtet wurden.

## **Flavobakterien und Wasserhärte bei Koi (und anderen Süßwasserfischen?) - Beobachtungen aus der Praxis**

Christine Lange, Gießen

Franziska Blakey, Biebertal  
Sandra Lechleiter, Neuenbürg

Fischcare Dr. Lechleiter, Fachtierarzt für Fische

### **Zusammenfassung**

In der Gruppe der Flavobakterien finden sich einige wichtige Pathogene für tropische Zierfische, Gartenteichfische und Speisefische. Die wichtigsten Vertreter sind *F. columnare*, *F. branchiophilum* und *F. psychrophilum*. Es gibt in der Literatur und in der Praxis Hinweise darauf, dass die Wasserhärte, neben anderen Wasserparametern, dabei eine Rolle spielt, ob Flavobakterien die Kiemengewebe infizieren können. Unter diesem Aspekt haben wir unsere Columnarisbefunde bei Koi der letzten Jahre ausgewertet und mit dem Härtebereich der betroffenen Teiche in Korrelation gesetzt.

### **Abstract**

Flavobacteria play an important role in gill diseases of ornamental fishes as well as in fishes kept in aquaculture. There are indications in literature and practice that the ability of Flavobacteria to attach to the gill filaments is correlated to water hardness. Diagnosis of *Flavobacter columnare* is made since 2014 by PCR. We detected our cases of *F. columnare* in Koi and correlated them to the hardness of the water source of the affected koiponds.

### **F. columnare bei Koi**

Typischerweise bricht die Kiemenerkrankung bei Wassertemperaturen zwischen 18 und 24 °C aus. Daher sind die meisten Fälle im Mai und Juni zu beobachten. Temperaturschwankungen wie sie beim Transport auftreten, und zu starke Fütterung bei noch niedrigen Wassertemperaturen sind häufig am Krankheitsgeschehen beteiligt. Auch beobachten wir regelmäßig eine (Sekundär-)Infektion durch Columnarisbakterien bei Virusinfektionen wie durch das KHV oder CEV. Meist sind nur Einzeltiere betroffen, deren Kiemen jedoch in sehr kurzer Zeit (wenige Stunden) ausgedehnte Nekrosen aufweisen können.

Therapeutisch verwenden wir Kochsalz, Chloramin T und andere Desinfektionsmittel.

#### Diagnose durch PCR

Die Diagnose wird durch ein Labor vorgenommen, das an Kiemenbiopsien neben dem KHV und CEV auch das *F. columnare* nachweisen kann. Verwendet wird eine Standard-PCR mit einem Primerpaar, das das 16S rRNA-Gen erkennt. Daraus resultiert ein knapp 1200 bp großes Amplifikat, das nach den Angaben des Labors *F. columnare* spezifisch ist.



Bild 1: Kiemenekrose durch *F. columnare* bei einem Koi.

#### *F. columnare* Nachweise in unserer Praxis in Süddeutschland

Von 2014-2018 erhielten wir insgesamt 44x den Nachweis des Bakteriums, dies aus Proben von erkrankten Kiemen mit Nekrosen aber auch aus Routineuntersuchungen von gesund erscheinenden Koi im Handel. In 31 Fällen wurde CEV und *F. columnare* zusammen in einer Probe gefunden, in 13 Fällen zusammen mit dem KHV. Zweimal wurden alle drei Erkrankungen in einer Kiemenprobe nachgewiesen. Von insgesamt 366 untersuchten Proben wurden in 90 Proben (24,6%) *F. columnare* nachgewiesen.

Unser Tätigkeitsgebiet umfasst Regionen mit völlig unterschiedlicher Geologie, das Teichwasser kann sehr weich (< 5 °dH) bis sehr hart >14 °dH sein.



Figure 1 consists of two charts. The left chart is a pie chart showing the distribution of water hardness (Wasserhärte) in degrees of hardness (°dH) across three categories: Weich (Soft), Mittel (Medium), and Hart (Hard). The right chart is a bar chart showing the monthly average water hardness (Wasserhärte °dH) from August 2014 to August 2018.

**Wasserhärte Distribution (Pie Chart):**

| Kategorie | Anteil (%) |
|-----------|------------|
| Weich     | 17 %       |
| Mittel    | 33 %       |
| Hart      | 50 %       |

**Wasserhärte Trends (Bar Chart):**

The bar chart displays monthly average water hardness (Wasserhärte °dH) from August 2014 to August 2018. The y-axis ranges from 0 to 40 °dH. The x-axis shows dates from 26.08.2014 to 07.08.2018. The chart shows significant fluctuations, with peaks around 34 °dH in late 2014 and mid-2018, and troughs around 4 °dH in late 2017 and early 2018.

Das Lehrbuch von E.J. Noga „Fish Disease“ (2010), weist auf Seite 166 drauf hin, dass der Mineralgehalt des Wassers wichtig ist für die Pathogenität von Flavobakterien und dass es in weichem Wasser weniger pathogen zu sein scheint. (1)

Untersucht ist auch, dass Calcium von vielen Mikroorganismen benötigt wird, um sich auf biologischen Substrate ansiedeln, denn es hilft dabei, den

elektrischen Widerstand zwischen den Zellen an den Membranen zu reduzieren. Polysaccharide wie Adhäsine werden hierdurch unterstützt. (3)

#### **Flavobakterien und Fischzucht**

In meiner Zeit im FGD waren die Forellenzuchten mit hartem Wasser ebenfalls stärker und häufiger von Erkrankungen durch *F. psychrophilum* betroffen. Auch gibt es Untersuchungen an amerikanischen Welsen, die eine Abhängigkeit der Infektionsrate von der Wasserhärte zeigen. (4)

Zusammenfassend kann man sich nur wünschen, dass über diese wichtige Gruppe von fischpathogenen Bakterien mehr Forschung betrieben werden möge.

Bedanken möchten wir uns bei Nele Lechleiter für die Auswertung und Grafik und bei Prof. Horst Kaiser, Department of Ichthyology and Fisheries Science, Rhodes University, South Africa für die fachliche Unterstützung bei der Literaturrecherche.

#### **Literatur**

- (1) Noga EJ (2010). Fish Disease. Second edition, Blackwell Science: 166
- (2) Decostere, A, Haesebrouck, F, Turnbull, JF, Charlier, G (1999). Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. Journal of Fish Diseases 22: 1–11
- (3) Geesey, GG, Wigglesworth-Cooksey, B, Cooksey, KE (2000). Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review. Biofouling 15: 195–205
- (4) Straus, DL et al. (2015). Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. Aquaculture 435: 252–256

## Fischtuberkulose in zwei Zoologischen Gärten – Pathologie und beteiligte Mykobakterienspezies

Heike Schmidt-Posthaus<sup>1\*</sup>, Cora Keller<sup>1</sup>, Thomas Jermann<sup>2</sup>, Regula Hirschi<sup>1</sup>, Bernd Schildger<sup>3</sup>, Roland Meier<sup>3</sup>, Christian Wenker<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Department für Infektiöse Erkrankungen und Pathobiologie, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern, Bern, Schweiz

<sup>2</sup>Zoo Basel, Binnigerstrasse 40, Basel, Schweiz

<sup>3</sup>Tierpark Bern (Dählhölzli), Tierparkweg 1, Bern, Schweiz

### Zusammenfassung

Die Fischtuberkulose ist eine chronische bakterielle Infektionskrankheit bei Süss- und Salzwasserfischen. Sie tritt weltweit auf und besitzt zoonotisches Potential. Bisher wurden mehr als 20 *Mycobacterium* Spezies mit weitgehend unbekannter Pathogenität beschrieben. *M. marinum* hat eine hohe Pathogenität und verursacht häufig Zoonosen. In dieser Studie wurden 47 Fälle der letzten zehn Jahre mit nachgewiesener oder vermuteter Fischtuberkulose aus zwei Zoologischen Gärten retrospektiv aufgearbeitet. PCR und Sequenzierung der involvierten *Mycobacterium* spp. wurden durchgeführt und die Daten mit klinischen und pathologischen Befunden verglichen. Die klinischen Symptome waren bei allen *Mycobacterium* spp. Fällen vergleichbar, mit Ausnahme der Fälle verursacht durch *M. marinum*, welche keine Hautläsionen zeigten. Die histologischen Veränderungen bei mit *M. marinum* infizierten Fischen waren akuter und stärker ausgeprägt als die durch andere *Mycobacterium* spp. verursachten Läsionen. Im Gegensatz zu den bisherigen Studien war *M. marinum* der vorwiegende Keim bei den Süsswasserfischen. Bemerkenswert war die Entdeckung von *M. holsaticum* in einem Meereswassersystem, dies ist somit die erste Publikation dieser *Mycobacterium* Spezies in Fischen.

### Summary

Fish tuberculosis is a lethal disease with zoonotic potential, found worldwide in both fresh and marine fish. More than 20 strains of *Mycobacterium* spp. are described in fish so far, often with unknown pathogenicity. However, *M. marinum* is reported as one of the most pathogenic agents for fish and is involved in zoonotic cases. We examined 47 different submissions from two zoological gardens, where fish tuberculosis was diagnosed or previously suspected during the last ten years. We collected PCR and sequencing data, which were compared to previously collected clinical and pathology data. The clinical signs caused by *Mycobacterium* spp. were similar in all cases,

except for fish infected by *M. marinum*, which showed no skin lesions. In our study material, lesions caused by *M. marinum* tended to be more acute and severe compared to lesions caused by other *Mycobacterium* spp.. In contrast to previous studies, we identified *M. marinum* as the predominant bacteria present within freshwater fish. Interestingly, we detected *M. holsaticum* in one of the seawater systems used in this project, being the first report of this *Mycobacterium* species in a fish.

### Einleitung

Fischtuberkulose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung bei verschiedenen Fischarten, ausgelöst durch diverse *Mycobacterium* spp. (Gauthier & Rhodes 2009, Lansdell et al. 1993). Der Krankheitsverlauf ist chronisch progressiv. Die Krankheitsanzeichen sind meist unspezifisch, wie Gewichtsverlust, schlecht heilende Hautwunden, Skoliose, Farbverlust oder Exophthalmus (Decostere et al. 2004). Die Mortalitätsrate ist meist gering. In den inneren Organen und der Haut sind multiple Granulome kennzeichnend für die Infektion (Gauthier et al. 2003). In der Histologie sind diese Granulome durch Makrophageninfiltration, Fibrose und zentraler Nekrose gekennzeichnet (Noga 2011). Mykobakterien sind säurefeste aerobe Organismen und lassen sich durch Spezialfärbungen, wie Ziehl-Neelsen, sichtbar machen (Ellis & Zabrowarny 1993). Durch molekulare Techniken wurde es möglich, die *Mycobacterium* Spezies zu differenzieren. So konnten einzelne pathogene Spezies identifiziert werden (Gauthier & Rhodes 2009, Mve-Obiang et al. 2003), darunter *M. marinum* als hochpathogener Stamm für Süß- und Meerwasserfische (Gauthier & Rhodes 2009, Noga 2011, Roberts 2001, Snieszko 1978). Ausserdem hat *M. marinum* das Potenzial, andere Vertebraten zu infizieren, u.a. den Menschen (Decostere et al. 2004, Johnson & Stout 2015, Maslow et al. 2002). Die Prävalenz von *Mycobacterium* spp. in Europäischen Aquarien wird zwischen 41,7% und 46,8 % beschrieben (Slany et al. 2014, Zanoni et al. 2008), während wenig über Fischtuberkulose in Wildfischpopulationen bekannt ist (Heckert et al. 2001). Es ist schwierig, die Infektion im Aquarium zu bekämpfen, da 1. das Bakterium bis zu 2 Jahren in feuchter Umgebung überleben kann, 2. die Infektion (ohne klinische Erkrankung) schwierig zu detektieren ist (Beran et al. 2006) und 3. Desinfektionsmassnahmen in einem laufenden System nicht praktikabel sind (Noga 2011). Zur Zeit gibt es keine erfolgreichen Behandlungsmöglichkeiten gegen eine Mykobakterien Infektion bei Fischen.

In dieser Studie wurden diagnostizierte- oder Verdachtsfälle von Mykobakteriosen aus zwei Schweizer Zoos (Zoo Basel, Tierpark Bern) ausgewählt, um die involvierten *Mycobacterium* spp. zu identifizieren. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: (i) welche *Mycobacterium* spp. sind involviert

und (ii) gibt es klinische oder pathologische Unterschiede zwischen Fischen infiziert mit *M. marinum* oder anderen Mykobakterien Spezies? Um diese Fragen zu untersuchen, wurde histologisches Archivmaterial des Zentrums für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI), Universität Bern, Schweiz der letzten zehn Jahre (2007-2016) untersucht.

#### **Material und Methoden**

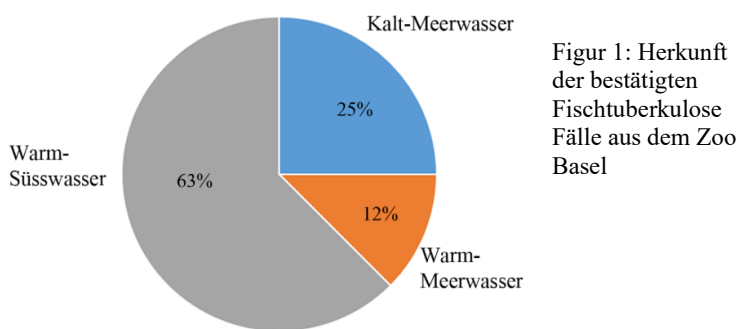
Archivmaterial von 2007 bis 2016 von bestätigten oder Verdachtsfällen von Fischtuberkulose aus dem Zoo Basel (30 Fälle) und Tierpark Bern (17 Fälle) wurden ausgewählt, basierend auf den Ergebnissen der Histologie. Um die Bakterienspezies zu identifizieren, wurden 20 µm Schnitte des Paraffinmaterials hergestellt, deparaffinisiert, lysiert und die DNA mittels DNeasy tissue Kit (QIAGEN, Hombrechtikon, Schweiz) extrahiert. Es wurde eine konventionelle PCR durchgeführt und eine 200 bis 300 Basenpaare lange Sequenz (abhängig von der Mykobakterien Spezies) des 16S-23S spacer amplifiziert. Die Primer Sp1 (5'-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3') und Sp2 (5'-GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA-3') wurden verwendet (Roth et al. 2000). Als Positivkontrolle diente eine vorgängig bestätigte Sequenz aus Guppies (*M. marinum*, 218 bp), als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Um die Spezifität zu bestätigen, wurden die PCR Produkte gereinigt (WIZAR RD@SV Gel und PCR Clean-Up System, Promega AG, Dübendorf, Schweiz) und zur Kontrolle des Molekulargewichtes auf 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden anschliessend sequenziert (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) und die Ergebnisse mit der GenBank Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen.

Die Histopathologie wurde in drei Gruppen eingeteilt: akute Makrophagenakkumulation mit Nekrose, jedoch ohne Granulombildung oder Fibrose), chronisch (gut begrenzte Granulome mit zentraler Nekrose, umgeben von Makrophagen und Fibroblasten) und chronisch-aktiv (beide Komponenten). Die Schweregrad wurde von 0 (keine Veränderungen) bis 6 (hochgradige Veränderungen) eingeteilt. Die Verteilung wurde von fokal bis systemisch klassiert. Zusätzlich wurden die Fälle eingeteilt in (i) wahrscheinliche Todesursache, (ii) mögliche Todesursache, (iii) Sekundärinfektion.

Für die Auswertung der klinischen Zeichen wurden folgende Kriterien verwendet: Dyspnoe, Farbveränderungen, Hautulzerationen, Apathie, Anorexie, motorische Störungen, andere Befunde. Zusätzlich wurde die Herkunft der betroffenen Tiere dokumentiert, Süss- oder Meerwasser, Kalt- oder Warmwassersysteme.

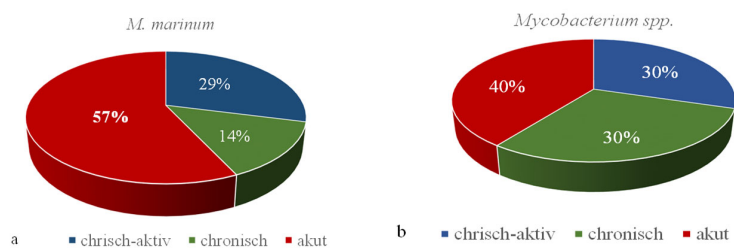
## Ergebnisse

47 Fälle wurden ausgewählt, 30 Fälle aus dem Zoo Basel aus vier unterschiedlichen Wassersystemen (Kalt-/Warm-Süßwasser, Kalt-/Warm-Meerwasser) und 17 Fälle aus dem Tierpark Bern. Im Tierpark Bern wurde nur zwischen Süß- und Meerwasser unterschieden, da der Tierpark Bern nur Warmwasseraquarien besitzt. Siebzehn Fälle konnten als Fischtuberkulose mittels PCR und Sequenzierung bestätigt werden. Von den bestätigten Fällen aus dem Zoo Basel stammten 63% aus Warm-Süßwasseraquarien, während lediglich 25% aus Kalt-Meerwasser stammten (Figur 1).



Figur 1: Herkunft der bestätigten Fischtuberkulose Fälle aus dem Zoo Basel

Positive Resultate wurden weiter unterschieden in Infektionen verursacht durch *M. marinum* und andere *Mycobacterium spp.*. 86% der *M. marinum* wurden aus Süßwasserfischen isoliert. Häufig wurden mehrere Mykobakterien Spezies in einem Fisch bzw. in Fischen einer Einsendung identifiziert. Infektionen, verursacht durch *M. marinum*, waren meist durch akute Läsionen gekennzeichnete, lediglich ein Fall zeigte chronische Veränderungen und zwei Fälle chronisch-aktive. Im Gegensatz dazu waren 30% der durch andere *Mycobacterium spp.* verursacht Läsionen chronischer Natur (Figur 2). Veränderungen ausgelöst durch *M. marinum* waren immer hochgradig, während die anderen *Mycobacterium spp.* weniger schwerwiegende Läsionen auslösten (Figur 3).



Figur 2: Art der Veränderungen ausgelöst durch a. *M. marinum* oder b. andere Mykobakterien Spezies; rot = akute Veränderungen, grün = chronische Veränderungen, blau = chronisch-aktive Veränderungen

Insgesamt wurden elf klinische Vorberichte ausgewertet. Die vorherrschenden klinischen Symptome waren Apathie, Farbveränderungen, Hautulzerationen und Anorexie. Mit *M. marinum* infizierte Fische zeigten niemals Hautläsionen, die übrigen Veränderungen waren in allen Fällen vergleichbar. Drei Bakterienspezies (*M. marinum*, *M. ulcerans* und *M. chelonae*) dominierten in sieben von acht Fällen, bei denen Fischtuberkulose als Todesursache identifiziert wurde.

In einem Silberflossenblatt (*Monodactylus argenteus*) aus einem Meerwasseraquarium wurde *M. holsaticum* isoliert. Dieser Fisch zeigte multiple Hautulzerationen. In dem gleichen Tier wurde *M. marinum* nachgewiesen.

### Diskussion

Nachdem Fischtuberkulose für lange Zeit mittels Morphologie, Kultur oder biochemischen Tests diagnostiziert wurde (Decostere et al. 2004, García-Martos & García-Agudo 2012), dominieren in den letzten Jahren die molekularbiologischen Methoden. (Jacobs et al. 2009, Neonakis et al. 2008, Pourahmad et al. 2009). Häufig stellt sich die Frage, inwieweit klinische Symptome zur Diagnostik verwendet werden können. Diese Symptome sind jedoch häufig unspezifisch und eine definitive Auswertung ist somit schwierig. Apathie, Farbveränderungen und Anorexie werden auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen beobachtet (Decostere et al. 2004, Dos Santos et al. 2002, Roth et al. 2000). Daneben werden in der Literatur unregelmäßige Hautulzerationen als typisches Bild der Fischtuberkulose beschrieben (Decostere et al. 2004, Dos Santos et al. 2002, Gauthier & Rhodes 2009, Roth et al. 2000). Diese Ulzerationen sind meist ein Zeichen eines chronischen Krankheitsverlaufes und sind ein Ausscheidungsweg des Bakteriums. In un-

serem Untersuchungsmaterial fanden sich lediglich in 30% der Fälle ausgelöst durch *Mycobacterium* spp. Hautulzerationen und in keiner der *M. marinum* Infektionen. *M. marinum* Infektionen verliefen meist systemisch und waren durch akute Veränderungen gekennzeichnet. *M. marinum* ist die Spezies, die am häufigsten im Zusammenhang mit schwerwiegender Fischtuberkulose genannt wird (Dos Santos et al. 2002, Gauthier & Rhodes 2009, Noga 2011, Swaim et al. 2006). In unserem Untersuchungsmaterial war die Infektion mit *M. marinum* ebenfalls mit hochgradigen akuten Veränderungen assoziiert. Bisher wurde *M. marinum* v.a. in Meerwasserfischen beschrieben (Roth et al. 2000). Im Gegensatz dazu fanden sich 86% unserer *M. marinum* Fälle in Süßwasseraquarien.

Eine hier identifizierte Bakterienspezies, *M. holsaticum*, wurde bisher ausschliesslich bei Säugern, v.a. beim Menschen, im Zusammenhang mit Lungentuberkulose beschreiben, noch nie in einem Fisch (Thacker et al. 2013). Die Bedeutung von *M. holsaticum* für das Krankheitsgeschehen in unserem Fall oder die Bedeutung von Fischen als Reservoir bleibt jedoch unklar.

#### Danksagung

Diese Studie wurde vom Zoo Basel und dem Tierpark Bern finanziert, und Eigenmittel des FIWI. Die Autoren bedanken sich bei dem Diagnostikteam des FIWI für die Bereitstellung der Sektionsunterlagen.

#### Literatur

- Beran V, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Pavlik I (2006). Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases* 29(7): 383-393
- Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F (2004). Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology* 99(3): 159-166.
- Dos Santos NMS, Do Vale A, Sousa MJ, Silva MT (2002). Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52(1): 87-91.
- Ellis RC, Zabrowarny LA (1993). Safer staining method for acid fast bacilli. *Journal of Clinical Pathology* 46(6): 559-560.
- Gauthier DT, Rhodes MW, Vogelbein WK, Kator H, Ottinger CA (2003). Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54(2): 105-117.
- Gauthier DT, Rhodes MW (2009). Mycobacteriosis in fishes: a review. *The Veterinary Journal* 180(1): 33-47.



- Heckert RA, Elankumaran S, Milani A, Baya A (2001). Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *Journal of Clinical Microbiology* 39(2): 710-715.
- Jacobs JM, Howard DW, Rhodes MR, Newman MW, May EB, Harrell RM (2009). Historical presence (1975–1985) of mycobacteriosis in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 85(3): 181-186.
- Johnson MG, Stout JE (2015). Twenty-eight cases of *Mycobacterium marinum* infection: retrospective case series and literature review. *Infection* 43(6): 655-662.
- Landsell W, Dixon B, Smith N, Benjamin L (1993). Communications: Isolation of several *mycobacterium* species from fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 5(1): 73-76.
- Maslow JN, Wallace R, Michaels M, Foskett H, Maslow EA, Kiehlbauch JA (2002). Outbreak of *Mycobacterium marinum* infection among captive snakes and bullfrogs. *Zoo Biology* 21(3): 233-241.
- Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PLC (2003). Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infection and Immunity* 71(2): 774-783.
- Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA (2008). Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiology Methods* 75: 1-11.
- Noga EJ (2011). *Fish disease: diagnosis and treatment*. John Wiley & Sons.
- Pourahmad F, Thompson KD, Adams A, Richards RH (2009). Detection and identification of aquatic mycobacteria in formalin fixed, paraffin embedded fish tissues. *Journal of Fish Diseases* 32(5): 409-419.
- Roberts RJ (2001). *Fish Pathology*. London: WB Saunder
- Roth A, Reischl UDO, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3): 1094-1104.
- Slany M, Makovcova J, Jezek P, Bodnarova M, Pavlik I (2014). Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 527-533.

- Snieszko SF (1978). Mycobacteriosis (tuberculosis) of fishes. Fish Disease Leaflet 55: 1-9.
- Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, Humbert O, Born DE, Ramakrishnan L (2006). *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. Infection and Immunity 74(11): 6108-6117.
- Thacker TC, Robbe-Austerman S, Harris B, Van Palmer M, Waters WR (2013). Isolation of mycobacteria from clinical samples collected in the United States from 2004 to 2011. BMC Veterinary Research 9(1): 100.
- Zanoni RG, Florio D, Fioravanti ML, Rossi M, Prearo M (2008). Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. Journal of Fish Diseases 31(6): 433-441.

## Herausforderungen bei der Identifizierung von Vibrionen aus Kreislaufanlagen für tropische Riesengarnelen (*Litopenaeus vannamei*) mit standarddiagnostischen Methoden

Julia Bauer<sup>1\*</sup>, Felix Teitge<sup>1</sup>, Lisa Neffe<sup>1</sup>, Mikolaj Adamek<sup>1</sup>, Arne Jung<sup>2</sup>, Christina Peppler<sup>3</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>, Verena Jung-Schroers<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>3</sup> Polyplan GmbH, Bremen, Deutschland

### Zusammenfassung:

Vibrionen sind Bakterien, die ubiquitär in Seewasser und als Normalflora auf der Haut und im Intestinaltrakt bei tropischen Riesengarnelen vorkommen. Es ist eine große Zahl von Arten aus unterschiedlichen Lebensräumen und mit großen Unterschieden im Stoffwechsel bekannt. Einige Arten spielen zum einen eine große Rolle als Pathogene in Aquakultursystemen für Garnelen, zum anderen kommen sie als Verursacher von Wundinfektionen und Durchfallerkrankungen beim Menschen vor.

Entscheidend für den Nachweis von Vibrionen ist eine sichere Identifizierungsmethode für solche möglicherweise pathogenen Arten. In dieser Studie wurden verschiedene Methoden zur Identifizierung untersucht. Voraussetzung für die Methoden ist die Eignung zum Einsatz als Standardmethode in diagnostischen Laboren. Molekularbiologisch wurden das 16S rRNA Gen mit zwei verschiedenen Sequenzlängen (V1-V5, V1-V8) und das housekeeping Gen *PyrH* sequenziert. Zusätzlich wurden eine biochemische Bestimmung und eine massenspektrometrische Bestimmung mittels MALDI-TOF durchgeführt.

Bei den Untersuchungen von *Vibrio*-Isolaten aus Kreislaufanlagen und Referenzstämmen mit den verschiedenen Identifizierungsmethoden, unterschieden sich die Ergebnisse für die meisten analysierten Isolate. Am sichersten konnten die meisten *Vibrio* spp. anhand der Sequenzierung eines Fragments des 16S rRNA Gens, das die variablen Regionen V1-V8 enthielt, identifiziert werden. Jedoch zeigte die Verwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie Vorteile in Schnelligkeit und bei der Identifizierung von pathogenen Spezies. Für mehrere spezifische *Vibrio* spp. ergaben sich Schwierigkeiten bei der Identifizierung. Diese resultierten hauptsächlich aus fehlenden Einträgen von Sequenzen in digitalen Datenbanken, einer geringen Menge vergleichbarer Isolate, die bis-

her analysiert wurden, und hohen interspezifischen Ähnlichkeiten der biochemischen Merkmale oder der Nucleotidsequenzen der jeweiligen *Vibrio*-Spezies.

#### **Summary:**

Vibrios are ubiquitous bacteria in especially marine and brackish aquatic environments. They are a part of the normal flora on shrimps' skin and in its digestive tract. There is a great number species from different environments, which show great differences in their metabolism. Some species play an important role as pathogens in aquaculture of shrimps. Others are the cause of wound infections or diarrhoea in humans.

For the detection of *Vibrio* sp. a reliable method of identification is necessary. Especially, when a detection of those pathogenic species is desired. This study compared different methods of identification, which are suitable for standard diagnostics in laboratories. As molecular biological method the 16S rRNA gene with two different sequence lengths (V1-V5, V1-V8) and the housekeeping gene *pyrH* were sequenced.

Additionally, a biochemical identification and an identification using mass spectrometry (MALDI-TOF) were conducted.

The investigations on the *Vibrio* isolates from RAS and type strains using the different identification methods show divergent results for many of the isolates. The 16S rRNA sequencing of the variable regions V1-V8 proved to be the most reliable method. Furthermore, using MALDI-TOF mass spectrometry fast and reliable results are possible, especially for pathogenic species. There were difficulties in reliably identifying some specific *Vibrio* sp.. Possible reasons are missing entries of sequences in the databases, a low number of comparable isolates, and high interspecific similarities of biochemical characteristics or nucleotide sequences.

#### **Einleitung**

Vibrien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, gekrümmte Stäbchen die meist polar begeißelt und beweglich sind. Sie kommen in See- und Brackwasser ubiquitär vor und gehören zur Normalflora der Körperoberfläche und des Magen-Darmtraktes der Garnelen. Die Garnelenproduktion in RAS in Deutschland und Europa hat in den letzten Jahren zugenommen, sodass Untersuchungen in diesem Bereich sinnvoll erscheinen. Im Zusammenhang mit *Vibrio*-Infektionen sind oftmals hohe Mortalitäten beschrieben. Dies wird durch meist hohe Gesamtkeimzahlen im Haltungssystem begünstigt, die durch hohe Besatzdichten und hohe Fütterungsraten entstehen.

### Warum ist die Identifizierung von *Vibrio* sp. in RAS wichtig?

Die Identifizierung einzelner *Vibrio* sp. ist wichtig, da es sowohl humanpathogene Vibrionen (z.B. *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) als auch für Garnelen pathogene Spezies (z.B. *V. parahaemolyticus*, *V. Harveyi*, *V. alginolyticus*) gibt. Beim Menschen gehören hämorrhagische Enteritiden oder Wundinfektionen zu möglichen Symptombildern. Auch Todesfälle infolge systemischer Infektionen sind beschrieben.

Bei Garnelen zeigt sich eine Infektion als Läsionen am Carapax, Infektionen der Muskulatur oder auch systemische Infektionen (Vibriose). Oftmals sind hohe Mortalitäten beschrieben.

Die **Ziele dieser Studie** betreffen sowohl die Tiergesundheit, als auch die Lebensmittelsicherheit. Im Vordergrund steht hierbei die schnelle und zuverlässige Identifizierung von möglichen human- bzw. garnelen- pathogenen *Vibrio* sp., die in RAS vorkommen.

### Material und Methoden

#### Proben

- Wasser, Biofilm der Garnelen-Oberfläche, Biofilm der Haltungseinrichtung (82 Isolate und 11 Referenzstämme)
- 3 verschiedene RAS
  - Versuchsanlage
  - Kommerzielle Anlage vor Tierbesatz
  - Kommerzielle Anlage mit akutem Verlustgeschehen
- Bakterienkultivierung (CSB Agar, CSB mit 2% NaCl, TCBS Agar)
- Identifizierung von *Vibrio* sp. mittels PCR (16S, 1420 bp)

#### Methoden zur Identifizierung

- 16S rRNA Gen Analyse (1420bp → V1-V8)
- 16S rRNA Gen Analyse (570bp → V5-V8)
- Analyse des Uridylat Kinase codierenden Gens PyrH
- Analyse der MSP- Spektren (BRUKER MALDI-TOF „microflex“)
- biochemische Identifizierung
  - API 20E (mit 2% NaCl im Medium), apiweb Datenbank
  - API 20E und zusätzliche Tests - Identifizierungstabellen von BULLER N. (2014)
  - Online Datenbank ([http://www.microrao.com/vibrio\\_ident.htm](http://www.microrao.com/vibrio_ident.htm))

## Resultate

|  |            | V1-V8 | V5-V8 | PyrH | MALDI-TOF | API20E<br>apiweb | Buller<br>2014 | Online<br>Datenbank |
|--|------------|-------|-------|------|-----------|------------------|----------------|---------------------|
| Ident >99% oder<br>Score Value >2,0/2,3    | EZBioCloud | 82,7  | 67    |      |           |                  |                |                     |
|  | NCBI       | 70,7  | 30,7  | 80   | 66/13     |                  |                | 19,5                |
| Übereinstimmung mit<br>Referenzmethode [%] | EZBioCloud | 100   | 45,6  |      |           |                  |                |                     |
|  | NCBI       | 19,5  | 16,7  | 53,9 | 38,1      | 1,9              | 28,8           | 5,6                 |
| DSM 2171<br><i>V. alginolyticus</i>        |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 10027<br><i>V. parahaemolyticus</i>    |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 19623<br><i>V. harveyi</i>             |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 10143<br><i>V. vulnificus</i>          |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 19283<br><i>V. fluvialis</i>           |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 17186<br><i>V. rotiferianus</i>        |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 17185<br><i>V. xuii</i>                |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 19270<br><i>V. campbelli</i>           |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 21205<br><i>V. pelagius</i>            |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 23055<br><i>V. owensii</i>             |            |       |       |      |           |                  |                |                     |
| DSM 19142<br><i>V. tubiashii</i>           |            |       |       |      |           |                  |                |                     |

Abb.1: Überblick der Identifizierungsergebnisse der untersuchten Referenzstämme; grün = korrekte Identifizierung, rot = falsche Identifizierung, weiss = Methode nicht angewendet.

Die Ergebnisse dieser Studie sind im „Journal of Fish Diseases“ veröffentlicht. Alle Ergebnisse, sowie die phylogenetischen Stammbäume können online eingesehen werden:

The results of this study are published in the “Journal of Fish Diseases”. All results and the phylogenetic trees can be viewed at online:

### Publikation

Bauer J, Teitge F, Jung A, Adamek M, Peppler C, Steinhagen D, Jung-Schroers V, 2018. Recommendations for identifying pathogenic *Vibrio* spp. as part of disease surveillance programmes in Recirculating Aquaculture Systems for Pacific White Shrimps (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Fish Diseases, DOI 10.1111/jfd.12897

## Fischsterben durch *Saprolegnia*-Infektionen in der Schweiz: Was steckt dahinter?

Damiana Ravasi<sup>1</sup>, Sophie de Respinis<sup>1</sup>, Mauro Tonolla<sup>1</sup>, Thomas Wahli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Laboratory of applied microbiology, University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland, Bellinzona, Schweiz

<sup>2</sup>) Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, Bern, Schweiz

### Zusammenfassung

In der Schweiz wurden seit 2009 vermehrt Sterben durch *Saprolegnia* sp. bei mehreren Fischarten in verschiedenen Gewässern festgestellt. 85 Isolate wurden basierend auf der Sequenzierung der ITS nrDNA auf Art-Ebene identifiziert. Es handelte sich vorwiegend um *S. parasitica* nebst einzelnen *S. australis* (5x), *S. delica* (2x) und *S. ferax* (1x).

Um dem Bedürfnis nach einer Zeit- und Kosten-effektiven Nachweismethode von *Saprolegnia*-Arten nachzukommen, wurden weitere Methoden getestet. So konnte die Anwendung von MALDI-TOF MS für die Identifikation erfolgreich etabliert werden, wies aber im Vergleich zur ITS Sequenzierung Schwächen auf. Erfolgversprechend war der Einsatz einer raschen DNA-Extraktion mit anschliessender neu entwickelter PCR für den Nachweis von *Saprolegnia* ssp. bzw. *S. parasitica*. Diese Methode lässt sich im Unterschied zu MALDI-TOF MS nicht nur für reine Kulturen, sondern auch für Direktkulturen ab infiziertem Wirtsgewebe anwenden.

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei den die Massensterben verursachenden Erreger um den immer gleichen Genotyp handelt, wurde ein neues Multilocus Sequenz Typisierungs (MLST) Schema basierend auf 7 „Housekeeping-Genen“ entwickelt. Damit konnten 77 *S. parasitica* Isolate charakterisiert werden. Gefunden wurden dabei 10 unterschiedliche Diploide Sequenztypen (DSTs). Die Mehrheit der berücksichtigten Isolate gehörten demselben Genotyp, nämlich DST3, an (53 %). Die entsprechenden Isolate stammten sowohl von Fischen aus Fischzuchten wie auch aus freien Gewässern aus der gesamten Schweiz sowie aus dem Doubs-System, in dem das erste Massensterben im Jahre 2009 festgestellt worden war. Ein weiterer Genotyp (DST7) zeigte ebenfalls eine Verbreitung über mehrere Gewässersysteme der Schweiz hinweg. Demgegenüber waren 8 weitere Genotypen auf einzelne Gewässer oder geografische Regionen beschränkt.

Histologisch unterschieden sich die durch die verschiedenen Genotypen verursachten Veränderungen nicht. Bei allen konnten sowohl oberflächliche Hautinfektionen als auch Hyphen bis in die Muskulatur gefunden werden.

Einerseits zeigen die Resultate eine gewisse Diversität von *S. parasitica* in der Schweiz. Andererseits könnte die weite Verbreitung eines einzelnen Genotyps (DST3) aber auch auf die Ausbreitung einer klonalen Population hindeuten.

### Summary

In Switzerland, an increase in episodes of *Saprolegnia* sp.-induced mass mortalities in different fish species and waterbodies has been observed since 2009. Eighty oomycete isolates could be retrieved and identified on species level based on ITS nrDNA sequencing. The vast majority of isolates were *S. parasitica* (77x), while only few other species were found: *S. australis* (5x), *S. delica* (2x) und *S. ferax* (1x).

Sequencing is laborious and costly therefore more time- and cost effective methods were evaluated. MALDI-TOF MS could successfully be established for the identification of *Saprolegnia* species. However, there were still some shortcomings when compared to ITS sequencing. Promising results could be achieved with a rapid DNA extraction method followed by a PCR using newly developed primers for *Saprolegnia* sp. and *S. parasitica*, respectively. In contrast to MALDI-TOF MS, the PCR could be used for direct cultures from fish.

To answer the question, whether all mortalities were related with one single genotype of *S. parasitica*, a new scheme of multilocus sequence typing (MLST) based on 7 housekeeping genes was established. This allowed to characterize 77 *S. parasitica* isolates. Ten different diploid sequence types (DST) were identified. The majority of all isolates (53%) belonged to DST3, while other genotypes were clearly less frequent. DST3 isolates originated from fish from farms and rivers all over Switzerland including the river Doubs in France, where first mass mortalities had occurred in 2009. A further genotype (DST7) was also present in more than one river system, while all other genotypes were restricted to one river system or geographic area.

Histological analyses revealed no differences in pathological features related to the various genotypes. In all types, both superficial skin infections as well as invasion of muscular tissue was observed.

The results demonstrate a large diversity of *S. parasitica* populations on one hand. However, the wide distribution of a single genotype (DST3) all over Switzerland could also be indicative for the spread of a clonal population.



## Einleitung

Im Sommer 2009 trat ein erstes Fischsterben im Schweizer Abschnitt des Doubs im Kanton Jura auf. Betroffen waren Barben (*Barbus barbus*) und Alet (*Squalius cephalus*). Das Sterben wiederholte sich im Frühling 2010, wobei diesmal Aeschen (*Thymallus thymallus*), Bachforellen (*Salmo trutta fario*) und einzelne Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) gestorben waren. Im Winter 2011 folgte ein Massensterben von adulten Bachforellen. Als einzige wiederkehrende Diagnose wurde bei allen Fischarten eine Verpilzung festgestellt. Ende 2013 und im Frühjahr 2014 wurden auch vermehrt verpilzte Fische in anderen Gewässern festgestellt. Betroffen waren die Aare im Kanton Aargau, die Areuse im Kanton Neuenburg, die Birs im Kanton Bern, der Rhein in den Kantonen Aargau, Basel und Schaffhausen) sowie die Versoix im Kanton Genf. 2015 war ein Grossteil der im Boden- und Untersee gefangenen Felchen von Pilzen befallen. Auch südlich der Alpen wurden immer wieder verpilzte Salmoniden festgestellt. Am Institut für Lebensmitteluntersuchung, Veterinärmedizin und Umwelt des Landes Kärnten untersuchte Isolate von Pilzen der betroffenen Fische erwiesen sich fast ausschliesslich als *Saprolegnia parasitica*. Die Befunde warfen die Frage auf, ob es sich bei den befallenen Fischen tatsächlich fast immer um eine *S. parasitica* Infektion handelte, und falls dies zutreffen sollte, ob es innerhalb dieser Erreger Unterschiede gibt. Um diese Fragen zu beantworten wurde ein Projekt mit dem Ziel gestartet, Methoden zu entwickeln, die es erlauben, a) *Saprolegnia* Arten zuverlässig zu identifizieren und b) *S. parasitica* Isolate zu typisieren.

## Material und Methoden

Für die Untersuchung standen 85 Isolate von 25 Stellen in der Schweiz und 3 Stellen in Frankreich von insgesamt 11 Fischarten zur Verfügung. Bei den Stellen in der Schweiz handelte es sich einerseits um Fischzuchten und andererseits um Fliessgewässer und Seen.

Alle Isolate wurden so angezüchtet, dass Einzelsporen bzw. Anzuchten aus Einzelsporen für Untersuchungen zur Verfügung standen (Methodik siehe Ravasi et al. 2018). Dasselbe Verfahren wurde auf Referenzstämme angewendet, welche von der "Fungal Biodiversity Culture Collection" (CBS, The Netherlands) wurden zu Vergleichszwecken weitere *S. parasitica* sowie andere *Saprolegnia*-Arten bezogen. Dabei handelte es sich um *S. australis*, *S. declina*, *S. ferax* und *S. litoralis*.

Für die Identifikation der *Saprolegnia* Art wurden verschiedene Methoden ausgetestet. Zunächst wurden sämtliche Isolate durch Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region des Nukleären Ribosomalen DNA (nrDNA) identifiziert (Diéguez-Urbeondo et al. 2007, Sandoval-Sierra et al. 2014). Als nächstes wurde die Anwendbarkeit von Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) evaluiert, wobei gemäss De Respinis et al (2013, 2014) vorgegangen wurde. Zum Einsatz kam ein AXIMA Confidence Mass Spektrometer von Shimadzu Biotech. Die Proteinmassenfingerprints wurden analysiert und umgewandelt, um ein Dendrogramm erstellen zu können. Für die Identifikation musste zunächst eine Datenbank mit den gewonnenen Isolaten sowie den Referenzstämmen erstellt werden.

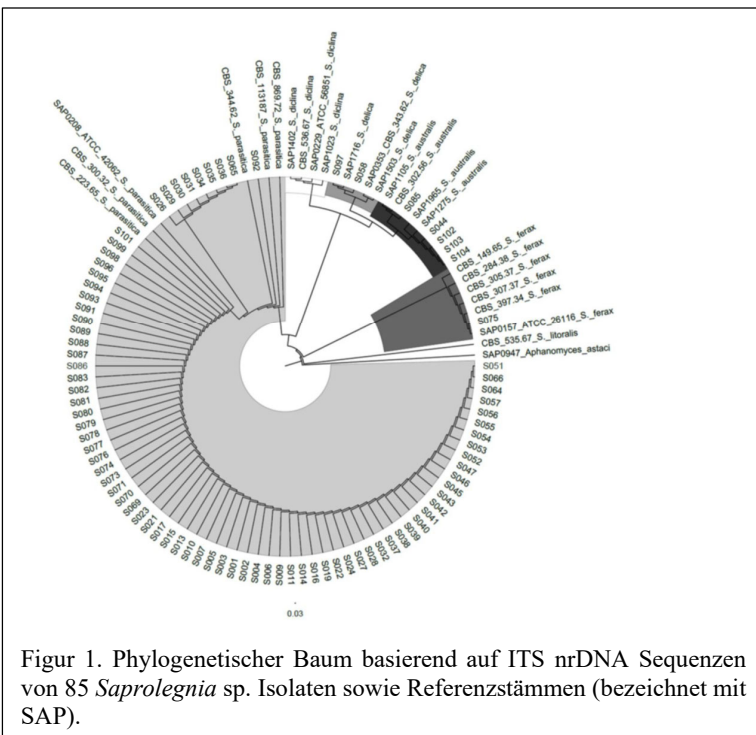
Als weitere Methode wurde eine PCR für *Saprolegnia* sp. und *S. parasitica* entwickelt. Ziel dabei war es, auf Sequenzierung und Sequenzanalysen verzichten zu können. Zu diesem Zweck wurden Primer für ITS1 und ITS2 Regionen ausgewählt (*Saprolegnia* spp.: forward 5'-CAA TTG AAA TAC AAC TTT CAA CAG-3' und reverse 5'-GCG ATT TGC TCT CTC TTT GA-3; *S. parasitica*: forward 5'-GAT TGG GAT GGA GCA GAC TG-3' and reverse 5'-CCT TGT ACT TTG ACA ACA GAC-3') und in silico mit den Sequenzen der in der Studie genutzten Referenzarten sowie weiteren publizierten Sequenzen von Oomyceten verglichen, um die Spezifität zu bestätigen.

Für die Typisierung der *S. parasitica* Isolate wurde ein Multilocus Sequence Typing (MLST) Schema mit sieben "Housekeeping-Genen" entwickelt (Ravasi et al. 2018). Für 4 der 7 Gen-Fragmente mussten neue Primer entworfen werden, da diese Sequenzen bisher nicht für MLST Untersuchungen eingesetzt worden waren. Jeder singulären Variante der einbezogenen 7 Gene wurde eine Nummer zugeordnet. Ebenso wurde mit jeder singulären Kombination von Allelen bei den Diploiden Sequenztypen (DST) verfahren. Basierend auf publizierten Methoden wurden Verwandtschaftsgrade und mögliche Klonale Komplexe erstellt. Isolate mit identischem DST vom selben Ausbruch und zur selben Zeit gewonnen, wurden als Replikate betrachtet und für die weiteren Untersuchungen nicht einbezogen. So standen von den ursprünglich 77 *S. parasitica* Isolaten nur noch 31 für die abschliessenden Analysen zur Verfügung.

## Resultate

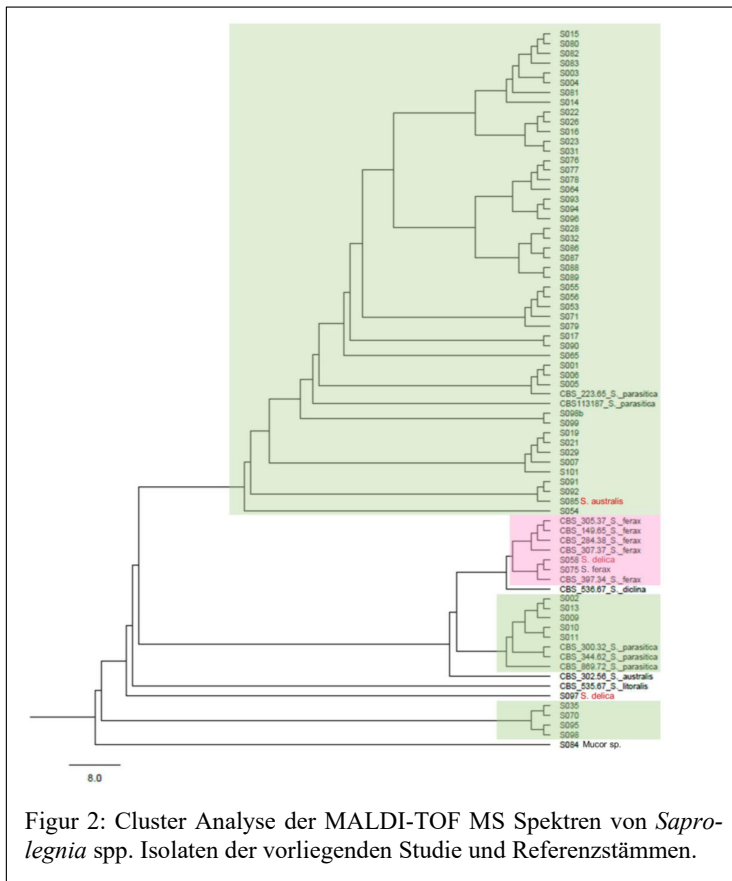
Mit der ITS nrDNA Sequenzierung konnten alle Isolate identifiziert werden (Fig. 1). Von den insgesamt 85 Isolaten erwies sich die grosse Mehrzahl als *S. parasitica* (90.6%), womit frühere Befunde bestätigt werden konnten. Bei den weiteren gefundenen Arten handelte es sich um *S. australis* (6.5%), *S. delica* (1.3%) und *S. ferax* (2.6%).

Mit dieser Methode war es nicht möglich, Unterschiede innerhalb der *S. parasitica* Isolate zu ermitteln. Von insgesamt 16 Fischen waren mehrere Isolate angezüchtet worden. Nur in einem einzigen Fall wurden dabei zwei unterschiedliche Arten festgestellt.



Figur 1. Phylogenetischer Baum basierend auf ITS nrDNA Sequenzen von 85 *Saprolegnia* sp. Isolaten sowie Referenzstämmen (bezeichnet mit SAP).

Die Analyse der MALDI-TOF MS Resultate zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen den vier Replikaten, welche pro Isolat gemacht worden waren (Fig. 2). Hingegen bildeten einerseits Isolate der verschiedenen *Saprolegnia* Arten im Dendrogramm keine eigenen Gruppen und andererseits fanden sich Isolate einer Art in unterschiedlichen Gruppen.



Die neu entwickelte PCR-Methoden erlaubten eine sichere Identifizierung von *Saprolegnia* spp. und *S. parasitica* von Kulturen aus Einzelsporen, aber auch von 2-3 Tage alten Kulturen direkt ab Fisch. Hingegen funktionierte die Methode nicht mit Material, das direkt vom Fisch entnommen worden war.

Mit dem angewandten MLST-Schema konnte unter Berücksichtigung von 7 "Housekeeping" Genen innerhalb der analysierten 31 Ausbrüche 10 DST identifiziert werden. Der häufigste Typ (DST3) wurde bei 16 Ausbrüchen festgestellt, was 51.6% entspricht. Weitere mehrfach gefundene Typen hatten Anteile von 9.7. 6.5 und 3.2%. Ein deutlicher Unterschied wurden zwischen

den Schweizer Isolaten und den Referenzstämmen festgestellt. DST3 wurde in allen vier Gewässersystemen der Schweiz festgestellt, DST7 in drei Systemen, alle übrigen DST's jeweils nur in einem System. Innerhalb der lokalen Typen zeigte sich eine relativ hohe Diversität.

DST's mit lediglich 1 bis 2 Unterschieden innerhalb der 7 Fragmente wurden in einem Klonalen Komplex (CC) zusammengefasst. Innerhalb des Untersuchungsmaterials konnte so ein Komplex (CC-1) mit zwei DST (DST3 und DST8) mit zusammen 17 Ausbrüchen und ein zweiter Komplex mit zwei DST (DST4 und DST11) mit zusammen 4 Ausbrüchen gebildet werden. Die restlichen DST's unterschieden sich in 5 bis 7 Loci und wurden daher als sogenannte "Singletons" angesehen.

Die histopathologischen Befunde stimmten mit früheren Beschreibungen von *Saprolegnia*-Infektionen bei Fischen überein. Meist lag eine partielle bis vollständig Erosion der Epidermis vor. Hyphen waren teils nur oberflächlich zu finden, teils aber auch in der Dermis, Subdermis oder der darunter liegenden Muskulatur. Die histologischen Bilder waren nicht spezifisch für einen bestimmten DST-Typ, d.h. bei den meisten DSTs konnten sowohl oberflächliche als auch tiefgehende Infektionen festgestellt werden.

#### **Diskussion und Folgerungen**

Als häufigster Erreger von Oomyceten-Infektionen in der Schweiz wurde *S. parasitica* ermittelt, während andere Arten nur in Einzelfällen vorkamen. Für die Artbestimmung ist die neu entwickelte PCR für *Saprolegnia* spp. und *S. parasitica* vielversprechend. Allerdings sind noch weitere Versuche notwendig, um die Methode auch für die Bestimmung von Oomyceten direkt ab Fisch einsetzen zu können. Mit kultiviertem Material ab Fisch funktioniert die PCR aber zuverlässig. Ein Vorteil gegenüber MALDI-TOF MS besteht darin, dass es für den Nachweis keine Reinkulturen braucht.

Die Artbestimmung mittels MALDI-TOF MS war noch nicht in allen Fällen erfolgreich. Die abweichenden MALDI-TOF MS Resultate könnten auf eine bakterielle Kontamination der Isolate zurückzuführen sein. Trotz Herstellung von Kulturen aus Einzelsporen, war es nicht immer möglich, Bakterien-freie Isolate herzustellen. Die Bakterien in den Isolaten könnten zu unerwünschten Signalen geführt haben.

MLST zeigte einerseits eine grosse Diversität innerhalb der *S. parasitica* Populationen, andererseits wurde ein Genotyp in allen vier grossen Gewässersystemen der Schweiz festgestellt. Unklar ist, wie es zur Verbreitung dieser Typen kam.

Die Studie hatte auch einige Schwächen. So erfolgte die Probenahme nicht zufällig, sondern hing von aktuellen Infektionsgeschehen ab. Dies kann dazu führen, dass die berücksichtigten Isolate nicht zwingend repräsentativ für einen bestimmten Ort sind. Im weiteren war die Anzahl einbezogener Isolate relativ gering. Dies hing nicht zuletzt damit zusammen, dass die Häufigkeit von Massensterben während der Projektphase deutlich zurückgegangen war und damit weniger Material gesammelt werden konnte. Trotz dieser Schwächen war es aber möglich, Aussagen zur Verteilung von *S. parasitica* Genotypen in der Schweiz zu machen und eine gewisse Klonalität festzustellen. Zudem bietet die Studie eine gute Grundlage für weitergehende Abklärungen.

#### Dank

Die Autoren danken allen Fischereibehörden, welche Material für das Projekt zur Verfügung gestellt haben. Verdankt wird auch die Finanzierung durch Bundes- und Kantonsbehörden sowie weitere Organisationen, welche das Projekt ermöglicht haben.

#### Literatur

- De Respinis S, Monnin V, Girard V, Welker M, Arsac M, Cellière B, Durand G, Bosshard PP, Farina C, Passera M, Van Belkum A, Petrini O, Tonolla M (2014). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12): 4286–4292
- De Respinis S, Tonolla M, Pranghofer S, Petrini L, Petrini O, Bosshard PP (2013). Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Medical Mycology*, 51(5): 514–521
- Diéguez-Urbeondo J, Fregeneda-Grandes JM, Cerenius L, Pérez-Iniesta E, Aller-Gancedo JM, Tellería MT, Söderhäll K, Martín MP (2007). Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology*, 44(7): 585–601
- Ravasi D, De Respinis S, Wahli T (2018). Multilocus sequence typing reveals clonality in *Saprolegnia parasitica* outbreaks. *Journal of Fish Diseases*, 41(11): 1653–1665
- Sandoval-Sierra JV, Martín MP, Diéguez-Urbeondo J (2014). Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): Defining DNA-based molecular operational taxonomic units. *Fungal Biology*, 118(7): 559–578.

Vorträge: Therapie im Wandel der Zeit

## Entwicklung und Testung eines Lebendimpfstoffes gegen das Koiherpesvirus

Klafack, Sandro<sup>1</sup>; Schröder, Lars<sup>1</sup>; Jin, Yeonhwa<sup>1</sup>; Avarre, Jean-Christophe<sup>2</sup>; Bergmann, Sven M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>): Friedrich-Loeffler-Institut, Deutschland

<sup>2</sup>) Institute of Evolutionary Sciences of Montpellier, Frankreich

### Zusammenfassung

Das Koiherpesvirus (KHV) ist Erreger der einzigen anzeigepflichtigen Erkrankung bei Karpfen bzw. Koi (*Cyprinus carpio*) in Deutschland. Grund für die Anzeigepflicht sind die verheerenden Auswirkungen der Infektion mit KHV (KHV-I) und der daraus resultierenden Erkrankung. In Folge eines Ausbruches kann im schlimmsten Fall der ganze Bestand verenden, dies mit teilweise schwerer Symptomatik. Sollten Tiere die Erkrankung überleben, sind sie danach lebenslänglich Träger und Überträger der Herpesviren. In den letzten Jahren war die deutsche Karpfen- und Koiwirtschaft immer wieder schwer von dem Virus getroffen worden. Nicht nur, dass in den letzten Jahrzehnten unzählige Kleinbetriebe oder familiär geführte Karpfenzuchten wegen KHV schließen mussten, sondern auch der Zierfischhandel ist davon betroffen. Allein von 2016 bis Juni 2018 wurden 104 Ausbrüche in Deutschland gemeldet. Darunter ein großer KHV-Ausbruch in Niedersachsen, bei dem unzählige Tiere eines Zierfischhändlers betroffen waren. Um diese Problematik zu bekämpfen oder weitest gehend einzudämmen, ist es notwendig einen Impfstoff, möglichst einen Lebendimpfstoff, zu erzeugen, welcher zumindest die Bestände vor den hohen Verlusten schützt. Zudem bietet ein Impfstoff die Möglichkeit eine Seuche lokal einzugrenzen. Wir werden hier Daten präsentieren, welche die erfolgreiche Erzeugung eines natürlich attenuierten KHV zeigt. Dieser Impfstoff ist auch in der Lage als genetische Markervakzine zu dienen. Zudem werden wir darlegen, inwieweit eine orale Verabreichung dieses Impfviruses möglich ist.



## Proteasen als alternative Desinfektionsmittel gegen Fischviren?

Becker, Anna Maria\*<sup>1</sup>; Oberle, Martin<sup>2</sup>; Christian, Jürgen<sup>3</sup>; Sven M, Bergmann<sup>4</sup>

- <sup>1</sup>) Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Deutschland;
- <sup>2</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Höchststadt/Aisch, Deutschland;
- <sup>3</sup>) Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Virologie, Erlangen, Deutschland;
- <sup>4</sup>) Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institut für Infektionsmedizin, Greifswald-Insel Riems, Deutschland

### Zusammenfassung

Fischzuchtanlagen sind ein Teil der traditionellen Landschaft in Deutschland und stellen eine wichtige Quelle für hochwertigen Speisefisch dar. In den Anlagen kann ein Ausbruch von Fischvirosen, wie z. B. die Koi- Herpesvirus-Infektion (KHVI), die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) oder die Infektiöse Hämato-poetische Nekrose (IHN) hohe Mortalitäten im Bestand und dadurch schwerwiegende ökonomische Einbußen verursachen.

Auf der Suche nach neuen effizienten, umweltfreundlichen und preiswerten Desinfektionsmitteln wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteasen zur Inaktivierung der Viren untersucht, welche die oben genannten Krankheiten auslösen: KHV, VHSV und IHNV. Um die Eignung kommerziell verfügbarer, biotechnologisch hergestellter Enzyme sowie einer nativen Protease für die beabsichtigte Anwendung zu prüfen, wurden drei unterschiedliche Proteaseformulierungen einbezogen: Neutrase® aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Novozymes, Lösung mit 0,95 U/gFormulierung), Alcalase® aus *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Lösung mit 2,59 U/gFormulierung) und Papain aus *Carica papaya* (Roche, Lösung mit 43 U/mgProtein und 16 mgProtein/mLFormulierung). Zuerst wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven der ausgesuchten Enzymprodukte mit den Zellkulturlinien, die zur Replikation der drei Zielviren benutzt werden, bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen und die jeweils mittlere effektive Konzentration - EC50 (48 h) - berechnet. Danach wurden Inaktivierungsversuche mit den drei Viren und den drei Proteasen bei 8 und 25 °C (24-h-Inkubation) durchgeführt, die Virustiter vor und nach der Behandlung bestimmt und die Titerreduktion ( $TR = \log_{10}T_{\text{Start}} - \log_{10}T_{\text{End}}$ ) berechnet. Anschließend wurde die Aktivität der Neutrase® und Alcalase® in Zellkulturmedium, Leitungswasser und Teichwasser über 14 bzw. 7 Tage mit Hilfe eines Enzymaktivitätsassays gemessen

sowie die Stabilität des Koi-Herpesvirus (KHV) in den genannten Flüssigkeiten geprüft.

Während die einzelnen Proteasen ähnliche Auswirkung auf alle drei untersuchten Zelllinien zeigten, konnten deutliche Unterschiede zwischen den EC50-Werten der respektiven Formulierungen beobachtet werden: ngEnzymformulierung/mL bei Alcalase®, µgEnzymformulierung/mL bei Neutrase® und mgEnzymprotein/mL bei Papain. Die höchsten Titerreduktionen wurden bei der Inkubation bei 25 °C von KHV, VHSV und IHNV mit Neutrase® verzeichnet (bis 6,4), die Behandlung der Viren mit Enzymmengen  $\geq$  der entsprechenden EC50- Werte führte, bis auf Alcalase® und IHNV, zur Inaktivierung der Viruspartikeln. Während Neutrase® und Alcalase® im Zellkulturmedium oder im Leitungswasser bis zu 14 Tage lang vergleichbare Aktivitäten zeigten, sanken sie nach 5 Tagen im Teichwasser auf unter 40 % der ursprünglichen Aktivität. Zuletzt wurde auch die Stabilität des KHV in den gleichen Wasserproben untersucht, wobei - wie erwartet - der Titer des Virus im Teichwasser innerhalb von wenigen Tagen unter der Nachweisgrenze des Assays lag.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Proteasen eine vielversprechende Alternative zu den klassischen Desinfektionsmitteln darstellen können. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen hinsichtlich Wahl des Enzymprodukts für die Anwendung unter den gegebenen Bedingungen notwendig.

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und anderer Formen nachhaltiger Wirtschaft.

## Entwicklung alternativer Bekämpfungsstrategien gegen *Ichthyophthirius multifiliis*

Teitge, Felix\*<sup>1</sup>; Hack, Franziska<sup>1</sup>; Jung-Schroers, Verena<sup>1</sup>; Adamek, Mikolaj<sup>1</sup>; Zielasko, Marcus<sup>2</sup>; Schmidt, Gregor<sup>2</sup>; Wedekind, Helmut<sup>2</sup>; Loy, Christina<sup>3</sup>; Kallert, Dennis<sup>3</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Tierärztliche Hochschule Hannover, Abteilung Fischkrankheiten, Deutschland;

<sup>2</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Institut für Fischerei (IFI), Deutschland;

<sup>3</sup>) Kallert & Loy GbR, Biologischer Dienst und Projektbüro, Deutschland

### Zusammenfassung

Infektionen mit dem Ziliaten *Ichthyophthirius multifiliis* stellen eine große Gefahr für Süßwasserfische dar. Infektionen können zu massiven Verlusten gerade in der Forellenteichwirtschaft führen. Eine Therapie, die früher z.B. mittels Malchitgrünoxalat erfolgreich durchgeführt werden konnte, ist zurzeit nicht möglich, da wirksame Therapeutika für Fische, die der Lebensmittelgewinnung dienen, nicht zugelassen sind. Es herrscht demnach in Deutschland ein Therapienotstand. Im Falle einer Infektion bei Speisefischen kann zurzeit nur durch Umweltdesinfektion und Managementmaßnahmen versucht werden, den Infektionsdruck zu verringern. Neben den rechtlichen Herausforderungen, die ein Einsatz von Bioziden mit sich bringt, ist auch die Wirksamkeit dieser Desinfektionsmaßnahmen häufig nicht zufriedenstellend und die Mortalitätsraten können im besten Fall nur reduziert werden.

Eine Herausforderung in der Bekämpfung von *I. multifiliis* liegt in dessen komplexen Entwicklungszyklus. Die Trophonten, die adulten Stadien des Parasiten, parasitieren in Epithelien der Fische und sind so vor äußeren Einflüssen geschützt. Die herangereiften Trophonten brechen aus den Epithelien heraus, wobei sie einen Großteil ihrer schädigenden Wirkung verursachen. Im Weiteren verkapseln sich diese zu Zysten (Tomonten), in denen sich wiederum Teilungsstadien, die Tomiten, bilden. Am Ende der Entwicklung werden die Tomiten aus den Zysten frei und befallen als Schwärmer (Theronten) wieder den Fisch. Nur dieses Schwärmerstadium kann durch Maßnahmen im Haltungswasser und in der Umwelt beeinflusst werden. Fische entwickeln nach überstandener Infektion mit *I. multifiliis* eine Immunität, wobei es sowohl zu spezifischen als auch unspezifischen Immunreaktionen kommt.

Im Rahmen eines Projektes werden alternative Bekämpfungsstrategien, die auch in der Teichwirtschaft eingesetzt werden können, untersucht. Dabei werden unter Berücksichtigung der Transmissions- und Infektionsbiologie

von *I. multifiliis* im Wesentlichen drei Bekämpfungsstrategien verfolgt und auf ihre Praxistauglichkeit überprüft.

Durch das Herausfiltern der Schwärmer aus dem Haltungswasser durch Nanofiltration, soll der Entwicklungszyklus des Parasiten unterbrochen werden. Zum anderen sollen Schwärmer im Haltungswasser abgelenkt oder abgefangen werden und somit an verschiedenen Stellen im Entwicklungszyklus in die Übertragung eingegriffen werden. Hierzu werden Substanzen getestet, die durch Auslösen des Wirtserkennungsverhaltens zum Abfangen und einem kürzeren Überleben der Schwärmer im Wasser führen. Zusätzlich wird untersucht, ob die Schwärmer durch Anheftung an eine Matrix quantitativ aus dem System entfernt werden können um den Infektionsdruck zu verringern. Weiterhin werden Fische mit verschiedenen Präparationen gegen *I. multifiliis* vakziniert. Zusätzlich wird getestet, ob mit Präparationen des Ziliaten Tetrahymena eine Kreuzimmunität ausgelöst werden kann.

Erste Ergebnisse zur Nanofiltration deuten darauf hin, dass die Anzahl der Parasitenstadien im Wasser durch diese Maßnahme reduziert werden können. Zur Transmissionsunterbrechung konnten bereits Substanzen gefunden werden, welche die Anheftung und Penetration der Schwärmerstadien, sowie deren Nahsuchverhalten auslösen. Diese Ansätze sollen nun optimiert und in die Praxis übertragen werden

## **Biosicherheit in der Aquakultur - rechtliche Anforderungen an Reinigung und Desinfektion**

Dirk Willem Kleingeld

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Task-Force Veterinärwesen

### **Zusammenfassung**

Aus veterinärrechtlichen Vorschriften ergeben sich für Betreiber von Aquakulturbetrieben Verpflichtungen in Verbindung mit der Reinigung und Desinfektion unter anderem der Haltungsumgebung, der Verarbeitungsräume und des Personals. Auf Grundlage der Tierseuchen- bzw. Fischseuchengesetzgebung ist jeder Tierhalter verpflichtet, Biosicherheitsmaßnahmen vorzuhalten. Auch aus dem Tierschutzgesetz ergibt sich die Verpflichtung, eine zuträgliche Haltungsumgebung beispielsweise mittels Hygienisierung sicherzustellen. Lebensmittelrechtliche Vorschriften enthalten Hygienevorschriften, in denen auf Reinigung und Desinfektion und im Übrigen auch auf die mögliche nachteilige Beeinflussung von Lebensmitteln durch Biozidprodukte hingewiesen wird.

Neben dem vorgenannten veterinärrechtlichen Bezug sind auch zahlreiche arbeits- und umweltrechtliche Anforderungen zu beachten. Zu nennen ist das Arbeitsschutzgesetz hinsichtlich Gefahren, die einerseits von Desinfektionsmitteln und andererseits auch von Biostoffen ausgehen können, für die wiederum Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen von Bedeutung sind.

Die Biozid-Verordnung regelt den Verkauf und die Abgabe sowie die Verwendung von Biozidprodukten, zu denen u. a. Desinfektionsmittel zur Hygiene im Veterinärbereich oder für den Lebens- und Futtermittelbereich gehören. Nach geltendem Recht dürfen entsprechend der Produktart zu Desinfektionszwecken nur verkehrsfähige Biozidprodukte erworben und verwendet werden. Zur Feststellung der Verkehrsfähigkeit von Biozidprodukten wird auf Herstellerinformationen und öffentlich zugängliche Datenbanken verwiesen.

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln unter anderem von der vorgeschalteten Reinigung und der Umgebungstemperatur abhängig ist. Eine Hygienisierung im aquatischen Milieu ist aufgrund der Beschaffenheit des Mediums Wasser immer eine besondere Herausforderung.

## Summary

Veterinary regulations impose obligations on operators of aquaculture establishments in relation to cleaning and disinfection, e. g. the housing environment, processing facilities and staff. Based on the animal health resp. fish diseases legislation, every livestock aquaculturist is required to provide biosafety measures. The German Animal Welfare Act also stipulates the obligation to ensure a beneficial housing environment, for example by means of sanitation. Food safety regulations also contain hygiene requirements, which refer to cleaning and disinfection and incidentally also to the possible adverse influence of aquaculture products by biocidal substances.

In addition to the aforementioned veterinary reference, numerous labor and environmental legal requirements must be taken into account. The German Labor Protection Law should be mentioned with regard to hazards that can arise on the one hand from disinfectants and on the other hand from biocidal substances, for which cleaning and disinfection measures are important.

The Biocidal Products Regulation regulates the sale, distribution and use of biocidal products, including e.g. disinfectants for veterinary hygiene or food and feed area. Under current legislation, only biocidal products may be purchased and used for disinfection purposes regarding the product type which are marketable. To determine the marketability of biocidal products, reference is made to manufacturer information and publicly accessible databases.

Finally, it should be noted that the effectiveness of disinfectants depends, among other things, on the upstream cleaning and the temperature of the environment. Hygienisation of an aquatic environment is always a particular challenge due to the nature of the medium of water.

## 1. Einführung

Biosicherheit umfasst Maßnahmen zur Verhinderung der Übertragung von Krankheitserregern auf Tiere, Menschen und die Umwelt. Als Beispiele für Biosicherheitsmaßnahmen sind Teich-, Becken-, Verarbeitungs- und Anlagenhygiene, die Bildung epidemiologischer Einheiten, eine Einschränkung des Besucherverkehrs, Zu- und Verkaufshygiene und auch Schutzmaßnahmen gegen Prädatoren zu nennen.

Zweifelsohne können Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen das Risiko der Ein- und Verschleppung von Krankheitserregern, beispielsweise über Fischeier, Transportwasser, Geräte oder Personen, deutlich herabsetzen.

Desinfektionsmaßnahmen dienen der gezielten Keimreduktion, um eine Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern. Sie können chemisch

oder auch physikalisch (z. B. thermisch, UV) erfolgen. Sie sind sowohl im Routinebetrieb als auch im Falle von Seuchen- bzw. Krankheitsgeschehen anzuwenden.

Eine gründliche Reinigung von Arbeitsflächen, Geräten, Räumen bzw. Haltungseinheiten ist, insbesondere aufgrund möglicher „Eiweißfehler“ unerlässlich für die Wirksamkeit der nachfolgenden Desinfektion. Unter Reinigung wird eine möglichst vollständige Beseitigung von (organischem) „Schmutz“ (Ausscheidungen, Schleim, Schuppen etc.) aus Haltungseinrichtungen, Räumen und von Oberflächen verstanden.

## **2. Rechtliche Anforderungen**

### **2.1 Tiergesundheitsrecht**

Gemäß §3 des Tiergesundheitsgesetzes (TierGesG) ist jeder Tierhalter verpflichtet, Biosicherheitsmaßnahmen vorzuhalten. Dazu gehören auch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, die im Übrigen auch im Zuge von Seuchenereignissen angeordnet werden können. Die auf Grundlage des § 7 TierGesG erlassene Desinfektionsrichtlinie des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) umfasst Mittel und Verfahren, die bei einer tierseuchenrechtlich vorgeschriebenen Desinfektion verwendet werden dürfen.

Weitere Anforderungen an Biosicherheit sowie an Reinigung und Desinfektion enthält die Fischseuchenverordnung. So können im Seuchenfall weitergehende Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen angeordnet werden. Darüber hinaus ist eine Schlusdesinfektion Voraussetzung für die Aufhebung einer Seuchenfeststellung. Außerdem sind Transportbehältnisse und beim Transport verwendete Geräte vor erneuter Benutzung zu reinigen und desinfizieren.

### **2.2 Tierschutzrecht**

Insbesondere aus der Haltungsnorm (§2) des Tierschutzgesetzes ergibt sich die Verpflichtung für Aquakulturbetreiber eine zuträgliche Haltungsumgebung, beispielsweise mittels Hygienisierung sicherzustellen.

### **2.3 Lebensmittelrecht**

Das „EU-Hygienepaket“, die Lebensmittelhygiene-Verordnung und die Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung enthalten Hygienevorschriften für Lebensmittelunternehmer mit Anforderungen an die Reinigung und Desinfektion. Darüber hinaus wird in den Vorschriften auch auf die mögliche nachteilige Beeinflussung von Lebensmitteln durch Biozidprodukte hingewiesen.

## 2.4 Arbeitsschutzrecht

Gemäß dem Arbeitsschutzgesetz haben Arbeitgeber Gefährdungsbeurteilungen durchzuführen.

Eine (chemische) Gefährdung kann sich unter anderem durch Desinfektionsmittel, z. B. Formaldehyd oder Peressigsäure, ergeben. In dem Zusammenhang ist die Gefahrstoffverordnung zu beachten.

Eine Gefährdung durch biologische Einwirkungen („Biostoffe“) kann für den Bereich der Aquakultur nicht ausgeschlossen werden. Als Beispiele sind der Fischbandwurm, die Fischtuberkulose oder auch bestimmte bewegliche Aeromonaden wie *Aeromonas sobria* zu nennen. Landwirtschaftliche Nutztierhaltungen, d. h. auch Aquakulturbetriebe, sind Gegenstand des Anwendungsbereiches der Biostoffverordnung, die natürlich auch Hinweise auf Reinigung und Desinfektion enthält. Mit Bezug auf die Biostoffverordnung sind auch die Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffen (TRBA) zu beachten. Relevant für die Aquakultur bzw. Gesundheitsfürsorge sind vor allem die TRBA 230 „Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in der Land- und Forstwirtschaft [...]“ und die TRBA 100 „Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien“.

## 2.5 Umweltrecht

Die Verordnung (EU) Nr. 528/2012 (Biozid-Verordnung) regelt den Verkauf und die Abgabe sowie die Verwendung von Biozidprodukten, zu denen u. a. Desinfektionsmittel zur Hygiene im Veterinärbereich oder für den Lebens- und Futtermittelbereich gehören. Biozidprodukte sind Stoffe/Gemische, die bestimmt sind, auf andere Art als durch bloße physikalische oder mechanische Einwirkung Schadorganismen zu zerstören, abzuschrecken, unschädlich zu machen, ihre Wirkung zu verhindern oder sie in anderer Weise zu bekämpfen.

Desinfektionsmittel müssen als Biozidprodukt verkehrsfähig sein, d. h. sie müssen im Falle von Altwirkstoffen entweder gemeldet sein oder sich im Entscheidungsverfahren befinden bzw. als Biozidprodukt zugelassen sein. Als für die Aquakultur relevante Anwendungsbereiche (Produktarten) sind zu nennen:

- Produktart 3 „Hygiene im Veterinärbereich“
- Produktart 4 „Lebensmittel- und Futtermittelbereich“
- Produktart 21 „Antifouling-Produkte“
- Ggf. Produktart 2 „Desinfektionsmittel und Algenbekämpfungsmittel, die nicht für eine direkte Anwendung bei Menschen und Tieren bestimmt sind“



Für sogenannte „Altwirkstoffe“, z. B. Chloramin T oder Formaldehyd, die sich noch im Entscheidungsverfahren bzw. im Prüfprogramm befinden, ist auf Grundlage der Übergangsvorschriften der Delegierten Verordnung (EU) Nr. 1062/2014 ein Inverkehrbringen noch (Stand: Januar 2019) möglich. Nicht genehmigte Wirkstoffe dürfen ab dem Zeitpunkt der Entscheidung noch 12 Monate vermarktet und 18 Monate verwendet werden.

Die Verkehrsfähigkeit eines Desinfektionsmittels wird durch eine N-Nummer (gemeldet / Entscheidungsverfahren) oder DE-Nummer (zugelassen) bestätigt. Das Zulassungsverfahren für Biozidprodukte ist zweistufig, d. h. zunächst erfolgt die Wirkstoffgenehmigung und danach die Zulassung.

In Bezug auf den Umgang mit chemischen Desinfektionsmitteln wird auf die Beachtung der Sicherheitsdatenblätter vor, während und nach der Anwendung hingewiesen. In dem Zusammenhang sind auch beispielsweise Vorschriften des Wasserhaushaltsgesetzes und des Bundes-Bodenschutzgesetzes zu beachten.

## **2.6 Arzneimittelrecht**

Biozidprodukte gelten grundsätzlich nicht als Arzneimittel im Sinne des Arzneimittelgesetzes. Entscheidend in dem Zusammenhang ist der Verwendungszweck, z. B. die Reduktion der Keimdichte ("Hygienisierung") im Fischhaltungswasser.

## **3. Praktische Hinweise, Hilfsmittel**

Hinsichtlich der Anwendung von Desinfektionsmitteln in der Aquakultur stehen zahlreiche Verfahrensanweisungen, (behördliche) Merkblätter, Leitfäden und Entscheidungshilfen zur Verfügung.

Mit Bezug auf die Fischseuchenbekämpfung sind in vorgenanntem Zusammenhang das Tierseuchenbekämpfungshandbuch der Bund-Länder Task Force Tierseuchenbekämpfung und auch die Desinfektionsrichtlinie des BMEL zu nennen. Aufgrund der Tatsache, dass bestimmte Angaben dieser Richtlinie nicht kohärent mit den biozidrechtlichen Vorschriften sind, wird diese Richtlinie derzeit (Stand: Januar 2019) überarbeitet. Beispielsweise ist die Anwendung von Natronlauge aus biozidrechtlicher Sicht nicht zugelassen. Sollte der Einsatz von Natronlauge im Tierseuchenbekämpfungsfall unerlässlich sein, kann die Anwendung im Einzelfall über das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit beantragt werden. In Bezug auf die erforderlichen Anwendungskonzentrationen wird auf die Herstellerinformationen und auch auf die öffentlich zugängliche Liste der DVG-geprüften Desinfektionsmittel ([www.desinfektion-dvg.de](http://www.desinfektion-dvg.de)) hingewiesen. Aus haftungsrechtlichen Gründen sind die Herstellerinformationen unbedingt zu beachten.

Mit Bezug auf das Chemikalien- bzw. Biozidrecht wird vor allem auf die Internetportale „REACH-CLP-Biozid Helpdesk“ ([www.reach-clp-biozid-helpdesk.de](http://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de)) und ([www.baua.de](http://www.baua.de)) der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin hingewiesen. Diese Portale enthalten Informationen z. B. zur Genehmigung oder Nichtgenehmigung von Wirkstoffen, weitere Informationen zur Biozid-Verordnung und Datenbanken zu gemeldeten Biozidprodukten, Biozidprodukten im Entscheidungsverfahren und zu zugelassenen Biozidprodukten. Mit Stand vom Januar 2019 wurden bisher lediglich 88 Biozidprodukte zugelassen, davon jedoch keine für die Produktarten 3, 4 oder 21. In dem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass weiterhin viele Biozidprodukte auch in der Aquakultur verwendet werden können, da sie („Altwirkstoffe“) entweder gemeldet sind oder sich im Prüfverfahren befinden. Wichtig jedoch ist der Hinweis, dass Desinfektionsmittel nur als Biozidprodukt und nicht als Chemikalie verwendet werden dürfen. Da die vorgenannten Datenbanken nicht tagesaktuell veröffentlicht werden, empfiehlt es sich immer Informationen über die Verkehrsfähigkeit mit Bezug auf den Anwendungsbereich bei den Herstellern einzuholen.

Mit Blick auf die Umsetzung rechtlicher Anforderungen sind weiterhin das Betriebsmanagement, Dokumentation, Schulungen und auch Arbeitsanweisungen für die Mitarbeiter wichtig. Eiweiß- und Kältefehler sind unbedingt zu vermeiden. Weitere Informationen zur Desinfektion in der Fischzucht enthält das Internetportal des LAVES ([www.laves.niedersachsen.de](http://www.laves.niedersachsen.de))

#### **4. Fazit**

Aus mehreren Rechtsbereichen wie Tierseuchenrecht, Tierschutzrecht, Lebensmittelrecht und Arbeitsschutzrecht ergeben sich für Betreiber von Aquakulturanlagen Verpflichtungen zur Durchführung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen. Solche Maßnahmen sind auch im Sinne der „Guten Fachlichen Aquakulturpraxis“ unerlässlich.

Weitere Vorschriften schränken jedoch die Wahl der Wirkstoffe bzw. der Desinfektionsmittel und Verfahren ein bzw. enthalten Anforderungen bezüglich der Anwendung. Zu nennen sind in dem Zusammenhang umweltrechtliche, tierseuchenrechtliche und ggf. auch arbeitsschutzrechtliche Vorschriften. Für Tierhalter und Personen der Fischgesundheitsfürsorge ist es wichtig diese Vorschriften zu kennen.

Die Wahl des Desinfektionsverfahrens ist abhängig von vielen Faktoren wie der Anwendungsbereich, die Art der Zielorganismen, das Desinfektionsmedium und die Umgebungstemperatur. Im Bedarfsfall empfiehlt sich eine Ab-

stimmung mit dem Hersteller oder im Seuchenereignis auch mit der zuständigen Behörde. Die Verkehrsfähigkeit von Biozidprodukten ist immer zu beachten.

Abschließend ist anzumerken, dass die Hygienisierung im aquatischen Milieu aufgrund der Beschaffenheit des Mediums Wasser eine besondere Herausforderung darstellt.

#### **Zitierte Rechtsnormen**

**Tiergesundheitsgesetz** in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. November 2018 (BGBl. I S. 1938)

**Fischseuchenverordnung** vom 24. November 2008 (BGBl. I S. 2315), die zuletzt durch Artikel 7 der Verordnung vom 3. Mai 2016 (BGBl. I S. 1057) geändert worden ist

**Tierschutzgesetz** in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2586) geändert worden ist

**Verordnung (EG) Nr. 852/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene; ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 1–54

**Verordnung (EG) Nr. 853/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs; ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 55–205

**Verordnung (EG) Nr. 854/2004** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs; ABl. L 139 vom 30.4.2004, S. 206–320

**Lebensmittelhygiene-Verordnung** in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Juni 2016 (BGBl. I S. 1469), die durch Artikel 2 der Verordnung vom 3. Januar 2018 (BGBl. I S. 99) geändert worden ist

**Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung** in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. April 2018 (BGBl. I S. 480 (619))

**Arbeitsschutzgesetz** vom 7. August 1996 (BGBl. I S. 1246), das zuletzt durch Artikel 427 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist

**Gefahrstoffverordnung** vom 26. November 2010 (BGBl. I S. 1643, 1644), die zuletzt durch Artikel 148 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist

**Biostoffverordnung** vom 15. Juli 2013 (BGBl. I S. 2514), die zuletzt durch Artikel 146 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist

**Verordnung (EU) Nr. 528/2012** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten Text von Bedeutung für den EWR; ABl. L 167 vom 27.6.2012, S. 1–123

**Delegierte Verordnung (EU) Nr. 1062/2014** der Kommission vom 4. August 2014 über das Arbeitsprogramm zur systematischen Prüfung aller in Biozidprodukten enthaltenen alten Wirkstoffe gemäß der Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates Text von Bedeutung für den EWR; ABl. L 294 vom 10.10.2014, S. 1–34

**Wasserhaushaltsgesetz** vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S. 2585), das zuletzt durch Artikel 2 des Gesetzes vom 4. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2254) geändert worden ist

**Bundes-Bodenschutzgesetz** vom 17. März 1998 (BGBl. I S. 502), das zuletzt durch Artikel 3 Absatz 3 der Verordnung vom 27. September 2017 (BGBl. I S. 3465) geändert worden ist

**Arzneimittelgesetz** in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist

**Literaturquellen können beim Autor angefordert werden**

## **Antibiotikaresistenzen in von Zier- und Speisefischen isolierten Bakterien zwischen 2005 und 2017**

Verena Jung-Schroers<sup>1\*</sup>, Arne Jung<sup>2</sup>, Julia Bauer<sup>1</sup>, Felix Teitge<sup>1</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Alle Bakterien, die in den Jahren 2005 bis 2017 aus diagnostischen Proben der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover isoliert wurden, wurden auf Resistenzen gegen Antibiotika getestet. Insgesamt wurde die Wirksamkeit von 19 antibiotisch wirksamen Substanzen gegen die nachgewiesenen Bakterien getestet. Die Wirksamkeit der Substanzen wurde mittels Agardiffusionstest ermittelt, der auf Blutagarplatten durchgeführt wurde. Die Hemmhofdurchmesser wurden beurteilt und soweit möglich anhand der Vorgaben des CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ausgewertet. Abhängig vom Durchmesser der Hemmhöfe, wurden die Bakterien als resistent (R), intermediär (I) oder sensibel (S) gegenüber dem getesteten Wirkstoff eingestuft.

Die getesteten Bakterien wiesen am häufigsten Resistenzen gegenüber Amoxicillin, Ampicillin, Neomycin, Oxolinsäure und Tylosin auf. Insgesamt nahmen die Resistenzen der Bakterien gegenüber Antibiotika innerhalb der letzten 13 Jahre ab und für die meisten antibiotisch wirksamen Substanzen konnte eine Verbesserung der Wirksamkeit ermittelt werden. Nur für einzelne Wirkstoffe, wie zum Beispiel Trimethoprim/Sulphonamid, erhöhte sich die Anzahl der resistenten Bakterien. Unterschiede bestanden in der Wirksamkeit der Antibiotika gegenüber Bakterien, die von Fischen aus unterschiedlichen Haltungseinrichtungen isoliert wurden. Insbesondere Bakterien, die von Zierfischen aus Groß- oder Einzelhandelsbetrieben nachgewiesen wurden, wiesen vermehrt Resistenzen gegen Antibiotika auf. Dagegen wurden die wenigsten Resistenzen in Bakterien, die aus Speisefischen isoliert wurden, nachgewiesen. Unterschiede wurden ebenfalls in der Wirksamkeit der Antibiotika gegen bestimmte Bakterienspezies ermittelt. Besonders Flavobakterien, einige Spezies der motilen Aeromonaden und Pseudomonaden wiesen häufig Resistenzen gegen mehrere getestete Antibiotika auf.

### Summary

All bacteria isolated between 2005 and 2017 from diagnostic samples submitted to the Fish Disease Research Unit of the University of Veterinary Medicine Hannover were tested for antibiotic resistance. Overall, the efficacy of 19 antibiotic agents against the detected bacteria was tested. The effectiveness of the substances was determined by agar diffusion test carried out on blood agar plates. The diameter of the inhibition zone was assessed and evaluated following the specifications of the CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) as far as possible. Depending on the diameter of the inhibition zones, the bacteria were classified as resistant (R), intermediate (I) or sensitive (S) to the tested drug.

Most resistences were detected against amoxicillin, ampicillin, neomycin, oxolinic acid and tylosin. Overall, bacterial resistance to antibiotics has decreased over the last 13 years, and efficacy has improved for most antibiotics. Only for individual active ingredients, such as trimethoprim / sulfonamide, the number of resistant bacteria increased. Differences were seen in the efficacy of the antibiotics against bacteria isolated from fish from different husbandry facilities. In particular, bacteria isolated from ornamental fish from wholesalers or retailers showed an increased resistance to antibiotics. In contrast, the lowest resistance levels were detected in bacteria isolated from food fishes. Differences were also found in the efficacy of the antibiotics against certain bacterial species. Especially flavobacteria, some species of the motile aeromonadas and pseudomonas showed often resistance to several of the tested antibiotics.

Resistenzen von Bakterien gegen Antibiotika stellen eine der größten Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren dar. Antibiotikaresistenzen können natürlicherweise auftreten aber auch der Selektionsdruck, der durch antibiotische Behandlungen auf die Bakterien ausgelöst wird, kann zur Entstehung von Resistenzen beitragen. Dieser Prozess wird durch den Missbrauch von Antibiotika beschleunigt. Eine Verlangsamung des Prozesses ist möglich durch die Vermeidung eines einseitigen Selektionsdrucks durch Antibiotika. Aus diesem Grund sollten gezielte Behandlungen nur im Bedarfsfall, nur ausreichend lange und mit einer ausreichend hohen Dosierung erfolgen. Es ist bekannt, dass Resistenzen gegen Antibiotika auch in aus Fischen isolierten Bakterien auftreten. Aus diesem Grund sollte vor einer antibiotischen Therapie von Fischen immer ein Antibiogramm der nachgewiesenen Bakterien angefertigt werden. Alle Bakterien, die in den Jahren 2005 bis 2017 aus diagnostischen Proben der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover isoliert wurden, wurden auf Resistenzen gegen

Antibiotika getestet. Insgesamt wurde die Wirksamkeit von 19 antibiotisch wirksamen Substanzen gegen die nachgewiesenen Bakterien getestet, wobei manche Substanzen durchgehend über 13 Jahre verwendet wurde, andere nur für einen Zeitraum von zwei bis 12 Jahren. Die Wirksamkeit der Substanzen wurde mittels Agardiffusionstest ermittelt, der auf Blutagarplatten durchgeführt wurde. Eingesetzt wurden Plättchen mit Amoxicillin (10 µg), Ampicillin (10 µg) Chloramphenicol (30 µg), Chlortetracyclin (30 µg), Colistinsulfat (50 µg), Doxycyclin (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Erythromycin (15 µg), Florfenicol (30 µg), Flumequin (30 µg), Furazolidon (100 µg), Gentamicin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Neomycin (10 µg), Oxolinsäure (10 µg), Oxytetracyclin (30 µg), Trimethoprim/Sulfonamid (25 µg) Tulathromycin (30 µg) oder Tylosin (30 µg) nach den Vorgaben des Herstellers. Die Hemmhofdurchmesser wurden beurteilt und soweit möglich anhand der Vorgaben des CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) ausgewertet. Abhängig vom Durchmesser der Hemmhöfe, wurden die Bakterien als resistent (R), intermediär (I) oder sensibel (S) gegenüber dem getesteten Wirkstoff eingestuft.

Die getesteten Bakterien wiesen am häufigsten Resistenzen gegenüber Amoxicillin, Ampicillin, Neomycin, Oxolinsäure und Tylosin auf. Als in den meisten Fällen wirksam stellten sich Doxycyclin, Tulathromycin und Enrofloxacin heraus. Insgesamt nahmen die Resistenzen der Bakterien gegenüber Antibiotika innerhalb der letzten 13 Jahre von ca. 45% auf etwa 28% ab und für die meisten antibiotisch wirksamen Substanzen konnte eine Verbesserung der Wirksamkeit ermittelt werden. Nur für einzelne Wirkstoffe, wie zum Beispiel Trimethoprim/Sulfonamid, erhöhte sich die Anzahl der resistenten Bakterien. Unterschiede bestanden in der Wirksamkeit der Antibiotika gegenüber Bakterien, die von Zierfischen und Speisefischen isoliert wurden. Mehr Resistenzen traten hier bei den Bakterien, die von Zierfischen isoliert wurden, auf und insbesondere die Wirkstoffe Enrofloxacin, Gentamicin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Neomycin und Flumequine stellten sich als weniger wirksam gegen die von Zierfischen isolierten Bakterien heraus. Auch bei Bakterien, die von zu Speisezwecken gehaltenen Cypriniden und Salmoniden stammten, wurden Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Antibiotika festgestellt. Zwar traten bei Bakterien, die von Cypriniden und Salmoniden isoliert wurden in etwa gleich häufig Resistenzen auf, jedoch wurden bei Bakterien von Cypriniden mehr Resistenzen gegenüber Colistinsulfat, Kanamycin und Neomycin beobachtet, während Bakterien von Salmoniden häufiger Resistenzen gegen Erythromycin, Furazolidon, Trimethoprim/Sulfonamid und Oxolinsäure aufwiesen. Die Herkunft der Fische und insbesondere die Haltungseinrichtungen spielte ebenfalls eine Rolle beim Auftreten von resistenten Bakterien. Insbesondere Bakterien, die von Zierfischen aus Groß-

oder Einzelhandelsbetrieben nachgewiesen wurden, wiesen vermehrt Resistenzen gegen Antibiotika auf. Dagegen wurden die wenigsten Resistenzen in Bakterien, die aus Speisefischen isoliert wurden, nachgewiesen. Unterschiede wurden ebenfalls in der Wirksamkeit der Antibiotika gegen bestimmte Bakterienspezies ermittelt. Besonders Flavobakterien, einige Spezies der motilen Aeromonaden und Pseudomonaden wiesen häufig Resistenzen gegen mehrere getestete Antibiotika auf.

Insgesamt scheint sich die Resistenzlage bei Bakterien, die von Fischen oder aus der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden, zu verbessern. Der leichte Anstieg der Resistenzen von Bakterien gegenüber Trimethoprim / Sulfonamid kann dadurch zustande kommen, dass Borgal® in Deutschland das einzige zugelassene Antibiotikum für Fische (Forellen) ist und der Wirkstoff daher regelmäßiger als andere eingesetzt wird. In jedem Fall empfiehlt es sich vor Antibiotikabehandlungen von Fischen ein Antibiogramm für die nachgewiesenen Bakterien durchzuführen.



## Risikomanagement zur Minimierung von krankheitsbedingten Verlusten in der Aquakultur neuer Fischarten – Identifizierung von relevanten Pathogenen

M. Rupp<sup>1\*</sup>, P-D. Sindilariu<sup>2</sup>, R. Knüsel<sup>3</sup>, B. von Siebenthal<sup>1</sup>, H. Schmidt-Posthaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin Universität Bern, Länggassstrasse 122, 3012 Bern (Schweiz)

<sup>2</sup>Tropenhaus Frutigen, Tropenhausweg 1, 3714 Frutigen (Schweiz)

<sup>3</sup>fishdoc GmbH, Schaubhus 1, 6026 Rain (Schweiz)

### Zusammenfassung

Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Zander (*Sander lucioperca*), zwei beliebte Speisefischarten in der Schweiz, sind neue und vielversprechende Kandidaten für die Speisefischproduktion. In den letzten Jahren wurden sie vermehrt in Kreislaufanlagen bei warmen Wassertemperaturen aufgezogen, um den Bedarf an Filet dieser Fischarten schnell und kosteneffizient zu decken. Um krankheitsbedingte Verluste zu verringern, wurden im Zuge eines von der Innosuisse unterstützten Projektes Daten erhoben und ausgewertet. Das Ziel des Projektes ist die Identifikation von relevanten Pathogenen, sowie die Etablierung von Methoden zur frühzeitigen Diagnose von Erkrankungen. Alle Ergebnisse werden in einen Prophylaxe- und Behandlungskatalog einfließen, mit dem Ziel, einerseits die mortalitätsbedingten Verluste zu verringern, andererseits die Produktion zu steigern und das Tierwohl zu verbessern. Im Rahmen des Projektes wurden *Ichthyobodo* sp. und *Gyrodactylus* sp. als relevante Parasiten identifiziert. Ein Ausbruch einer Infektion mit *Aeromonas salmonicida* sowie mehrere Fälle einer *Perch Rhabdovirus* Infektion wurden dokumentiert und diese Erreger ebenfalls zu den relevanten Pathogenen gezählt.

### Summary

European perch (*Perca fluviatilis*) and pike perch (*Sander lucioperca*), both popular food fish species in Switzerland, are new and promising candidates for food production. In the last years, they were mostly raised in warm water recirculating aquaculture systems to cover the demand of fillets fast and cost-effectively. During the project supported by the Innosuisse, data were collected and evaluated to reduce disease induced mortality. The aim of this project is to identify relevant pathogens, and to establish methods to diagnose diseases at an early stage. All results will be incorporated in a prophylaxis and treatment catalogue with the goal to reduce losses due to mortality, to increase production and to improve animal welfare. In the context of the project, *Ichthyobodo* sp. and *Gyrodactylus*

sp. were identified as relevant parasites. An outbreak of an *Aeromonas salmonicida* infection as well as several infections with Perch Rhabdovirus were recorded and these agents were counted as relevant pathogens.

Das dreijährige Projekt ist eine Kooperation zwischen der Nationalen Fischuntersuchungsstelle der Universität Bern, dem Tropenhaus Frutigen und der fishdoc GmbH und startete im Februar 2017. Alle erfassten Daten und Proben stammen aus dem Tropenhaus Frutigen. Die Fischzucht des Tropenhauses umfasst mehrere Kalt- und Warmwasser Kreislaufanlagen für die Produktion von Zander, Flussbarsch, Äschen (*Thymallus* sp.) und Stör (*Acipenser baerii*, *Acipenser gueldenstaedtii*). Zander und Flussbarsch werden als Fingerlinge von verschiedenen Lieferanten zugekauft und zunächst in eine Quarantäne überführt. Die Flussbarschfingerlinge haben bei Ankunft in der Quarantäne im Schnitt ein Gewicht von mindestens 2g, die Zanderfingerlinge von mindestens 10g. Die Quarantäneanlage besteht aus einer Aussen- Kreislaufanlage, die im Jahr 2017 total 142 m<sup>3</sup> umfasste und in 2018 auf 222 m<sup>3</sup> erweitert wurde. Nach Ablauf der Quarantänezeit von mind. 14 Tagen werden die Fingerlinge in eine 3'500 m<sup>3</sup> grosse Innen- Kreislaufanlage überführt. In dieser Anlage verbleiben sie bis zum Erreichen ihres Schlachtgewichtes, beim Zander  $\geq 800$ g und beim Flussbarsch ca. 200g. Vor der Schlachtung werden beide Fischarten zur Hälterung aus der Kreislaufanlage in eine Durchflussanlage überführt. Dieser Produktionszyklus wurde im Rahmen des Projektes zum jetzigen Zeitpunkt bereits zwei Jahre medizinisch begleitet. An verschiedenen Zeitpunkten wurden sowohl erkrankte als auch gesunde Fische beprobt. Erste Ergebnisse zeigen, dass folgende Pathogene eine wichtige Rolle für die Fischgesundheit in der Produktion von Zander und Flussbarsch in Kreislaufanlagen darstellen.

***Gyrodactylus* sp.**, ein Vertreter der Hakensaugwürmer, ist ein häufiger Parasit bei wildlebenden und auch bei kultivierten Fischen. Bei einem geringen Befall zeigen die Fische in der Regel keine Auffälligkeiten. Bei schlechten hygienischen Bedingungen, Stress und/oder schlechter Wasserqualität können sich *Gyrodactylus* sp. schnell vermehren. Kommt es zum Massenbefall zeigen die Fische eine erhöhte Schleimproduktion, Hautrötungen, Einblutung in die Haut und häufig auch Sekundärinfektionen. Besonders bei kleinen Fischen und hoher Parasitenlast kann es zu einer erhöhten Mortalität kommen (Noga 2013). Mit *Gyrodactylus* sp. infizierte Zander oder Flussbarsche zeigen Hauteizungen und ein unkontrolliertes Schwimmverhalten. Durch häufiges Abstreifen an Beckenwänden oder auch an anderen Fischen kann es zu Hautverletzungen kommen, die einen guten Nährboden für Bakterien und Pilze darstellen und sich häufig sekundär infizieren. Besonders bei den Zandern wurde während einer Infektion mit *Gyrodactylus* sp. eine erhöhte Mortalität festgestellt.

***Ichthyobodo* sp.**, ein kleiner einzelliger Parasit auf Haut und Kiemen, ist bei reinen Aquakulturfischen aus Kreislaufanlagen immer wieder nachweisbar. *Ichthyobodo* sp. ist in der Lage, gesunde Larven und sogar Eier zu infizieren und dort grossen Schaden anzurichten. Bei ausgewachsenen Fischen zeigt sich eine Infektion häufig als Begleiterscheinung von Stress. Gewebeirritation und -hyperplasie sowie eine gesteigerte Schleimproduktion sind einige der Folgen einer *Ichthyobodo* sp. Infektion (Noga 2013). Stressige Situationen, wie Transporte und das nötige Handling während der Produktionsabläufe, machen die Fische anfällig für *Ichthyobodo* sp.. Auf gestressten und immunsupprimierten Fischen kann sich *Ichthyobodo* sp. durch Zweiteilung rasant vermehren und ausbreiten. Durch Reizung der Haut und auch des Kiemenepithels kann es vor allem bei kleinen Zandern und Flussbarschen zu grossen Verlusten kommen.

Das Bakterium ***Aeromonas salmonicida*** erwies sich im Laufe des Projektes von grosser Bedeutung bei krankheitsbedingten Verlusten von Flussbarschen. *A. salmonicida* ist der Erreger der Furunkulose, einer Erkrankung, die vor allem bei Salmoniden grossen wirtschaftlichen Schaden anrichtet.

Der Erreger wurde erstmals 2008 bei wildlebenden Flussbarschen, bei winterlichen Temperaturen von 6°C, Grad beschrieben (Skrodenytė- Arbačiauskienė et al. 2010). 2018 wurde während des Projektes im Rahmen der Abklärung einer erhöhten Mortalität bei Flussbarschen in der Warmwasser Kreislaufanlage, eine systemische Infektion mit *A. salmonicida* nachgewiesen. Die Wassertemperatur zum Zeitpunkt der Infektion betrug ca. 20°C. Die Erkrankung zeichnete sich durch eine erhöhte Mortalität der infizierten Flussbarsche von ca. 3% pro Woche aus. Betroffene Fische zeigten tiefe, bis in die Muskulatur reichende Hautulzerationen. Histologisch waren Muskelfasernekrosen sichtbar. Das Bakterium konnte in grosser Anzahl sowohl aus der Muskulatur als auch aus der Niere von infizierten Fischen isoliert werden (Rupp et al. 2019). Der Nachweis von *A. salmonicida* erfolgte durch Ausstrich von Organproben auf Columbia Blut Agar (BioMérieux, Geneva, Schweiz) und anschliessender Inkubation bei 22°C über 24 Stunden. Verdächtige Kolonien wurden mittels microflex LT MALDI- TOF (Bruker Daltonics, Faellanden, Schweiz) als *A. salmonicida* identifiziert. Weitere Untersuchungen umfassten zwei PCRs zum Nachweis der Gene *exsD* und *traC*, zweier Loci auf dem Plasmid namens *pA-sa5/pASvirA*, welches auch das Typ 3 Sekretionssystem (TTSS) von *A. salmonicida* beinhaltet (Emond- Rheault et al. 2015). Die Ergebnisse dieser PCRs zeigten, dass bei dem isolierten *A. salmonicida* Stamm die Gene des TTSS vorhanden waren. Das TTSS ist einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *A. salmonicida*, es erlaubt dem Bakterium, seine Toxine direkt in die Wirtszelle zu injizieren und ist somit essentiell für die

Zytotoxizität (Burr et al. 2005; Burr & Frey 2007; Burr et al. 2002). Auf dem Plasmid pAsa5/pASvirA kann es bei höheren Kultivierungstemperaturen von >20°C zur Verbindung zweier Insertionssequenzen kommen, wodurch Teile des Plasmides abgespaltet werden. Durch diese Abspaltung gehen die genetischen Informationen des TTSS verloren, woraus ein apathogener *A. salmonicida* Stamm resultiert (Burr et al. 2003a; Daher et al. 2011; Struber et al. 2003, Tanaka et al. 2013). Der aus der Warmwasser Kreislaufanlage isolierte *A. salmonicida* Stamm zeigte eine Temperaturanpassung. Selbst bei einer Kultivierungstemperatur von 28°C waren immer noch Kolonien vorhanden, die das TTSS beinhalten. Diese Anpassung eröffnet dem Bakterium eine breite Palette an neuen Warmwasser-Wirten und könnte in Zukunft dazu führen, dass *A. salmonicida* eine grössere wirtschaftliche Rolle bei Warmwasseranlagen spielt (Rupp et al. 2019).

Neben Verlusten durch parasitäre und bakterielle Infektionen spielten auch Verluste durch Virusinfektionen eine grosse Rolle.

Das **Perch Rhabdovirus** (PRV) wurde erstmals 1980 (Dorson et al. 1984) identifiziert. Die Erkrankung trat damals in Frankreich auf und verursachte grössere Schäden in der Flussbarsch Aquakultur. Die betroffenen Fische zeigten abnormale Schwimmbewegungen wie Kreisschwimmen, Lethargie und Blutungen an den Flossenbasen (Bigarré et al. 2017). Während des Projektes gab es mehrere Ausbrüche von PRV sowohl bei den Flussbarschen als auch bei den Zandern in der Warmwasser Kreislaufanlage. Infizierte Fische zeigten das in der Literatur beschriebene Verhalten mit Kreisschwimmen und Lethargie. Die Blutungen an den Flossenbasen waren weder beim Zander noch beim Flussbarsch ausgeprägt. Die Fische waren nach Auftreten der Symptome nicht mehr in der Lage, Futter aufzunehmen und viele starben nach einigen Tagen auf Grund von Erschöpfung. Der Nachweis von PRV erfolgte mittels Zellkultur auf bluegill fry und epithelioma papulosum cyprinid Zellen über einen Bebrütungszeitraum von 2 Wochen mit einmaliger Subkultur nach einer Woche. Parallel zur Zellkultur erfolgte der Nachweis mittels PCR nach Bigarré et al. 2017. Für beide Nachweismethoden wurde ZNS Gewebe infizierter Fische verwendet. Der Nachweis erfolgte jeweils noch während der Quarantänephase und eine weitere Verbreitung des Virus auf der Anlage konnte somit verhindert werden.

#### Fazit

Die Anforderungen an die Fischzüchter und die Produktionssysteme steigen zunehmend. Die Einführung neuer Produktionsanlagen, wie zum Beispiel Kreislaufanlagen, sowie neuen Fischarten, wie Zander und Flussbarsch, erfordern Anpassungen der Produktionsabläufe und des Gesundheitsmanage-

ments. Neue oder angepasste Pathogene sollten konsequent überwacht werden, um die Fischgesundheit, das Tierwohl und auch die Produktivität zu gewährleisten und zu verbessern.

#### Danksagung

Herzlichen Dank an alle Projektbeteiligten, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre. Insbesondere an Regula Hirschi und Barbara Müller, Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, für die technische Assistenz. Und an das Team der Fischzucht des Tropenhauses Frutigen für ihr stetiges Feedback und ihre Mitarbeit.

Diese Arbeit wurde von der Innosuisse unterstützt (Projektnummer 25178.1 PFLS-LS).

#### Literatur

Bigarré, L., Plassiart, G., de Boissésou, C., Pallandre, L., Pozet, F., Lendoré, Y., Fontaine, P., & Loeffrig, F. (2017) Molecular investigations of outbreaks of *Perch perhabdovirus* infection in pike-perch. *Diseases of Aquatic Organisms*, 127, 19-27

Burr, S.E., & Frey, J. (2007). Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 30(11), 711-714

Burr, S.E., Pugovkin, D., Wahli, T., Segner, H., & Frey, J. (2005). Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology*, 151, 2111-2118

Burr, S.E., Stuber, K., & Frey, J. (2003). The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *Journal of Bacteriology*, 185(22), 6583-6591

Burr, S.E., Stuber, K., Wahli, T., & Frey, J. (2002). Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol*, 184(21), 5966-5970

Daher, R.K., Fillion, G., Tan, S.G., Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V.E., & Charette, S.J. (2011). Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Veterinary Microbiology*, 152(3-4), 353-360

Formatiert: Deutsch (Schweiz)

▲ Dorson, M., Torchy, C., Chilmoneczyk, S., de Kinkelin, P., & Michel, C. (1984). A *rhabdovirus* pathogenic for perch; *Perca fluviatilis* L.: isolation and preliminary study. *Journal of Fish Diseases* 7, 241- 245 Noga, E. J. (2013). *Fish disease: Diagnosis and treatment*, 2nd ed.

Wiley-Blackwell, Iowa, Print ISBN 9780813806976. Online ISBN:9781118786758

Rupp, M., Pilo, P., Mueller, B., Knuesel, R., von Siebenthal, B., Frey, J., Sindilariu, P-D., & Schmidt- Posthaus, H. (2019). Systemic infection in European perch with thermoadapted virulent *Aeromonas salmonicida* (*Perca fluviatilis*). *Journal of Fish Diseases*

Skrodenytė-Arbačiauskienė, V., Kazlauskienė, N., Vosylienė, M.Z., & Virbickas, T. (2010). Identification of *Aeromonas salmonicida* in European perch from North Lithuanian rivers during mass mortalities in 2008. *Central European Journal of Biology*, 2010 5(6): 831-838

Stuber, K., Burr, S.E., Braun, M., Wahli, T., & Frey, J. (2003). Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3854-3856

Tanaka, K.H., Frenette, M., & Charette, S.J. (2013). IS-mediated loss of virulence by *Aeromonas salmonicida*: A tangible piece of an evolutionary puzzle. *Mobile Genetic Elements*, 3(1), e23498

**Formatiert:** Deutsch (Schweiz)

Vorträge: Klimawandel, Umwelt und Fischgesundheit

## **Climate Trout: Kombinierte Effekte von Klimawandel und *Malacosporea*-Infektionen auf wilde Bachforellenpopulationen**

Waldner, Karoline\*<sup>1</sup>; Auer, Stefan<sup>2</sup>; Bechter, Thomas<sup>2</sup>; Borgwardt, Florian<sup>2</sup>; Unfer, Günther<sup>2</sup>; El-Matbouli, Mansour<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Veterinärmedizinische Universität Wien, Wien, Österreich

<sup>2</sup>) Universität für Bodenkultur Wien, Wien, Österreich

### **Zusammenfassung**

Hintergrund: PKD (proliferative kidney disease) ist eine aufkommende parasitäre Erkrankung, die Salmoniden sowohl in der Aquakultur als auch in Freigewässern betrifft. Äußerlich führt die Krankheit zu unspezifischen Symptomen wie Dunkelfärbung der Haut, Exophthalmus, Aszites sowie Anämie. Charakteristische Veränderungen der inneren Organe sind die Vergrößerung von Niere und Milz. Steigende Wassertemperaturen, wie sie der Klimawandel mit sich bringt, führen zu einem schwerwiegenderen Verlauf der PKD.

Projektziel: ClimateTrout ist ein vom Klima- und Energiefonds finanziertes Projekt, dessen Ziel die Erforschung der Wechselwirkungen von Wassertemperaturen, der Verbreitung von Moostierchen und Bachforellen sowie dem Auftreten der PKD ist. Die Ergebnisse zur Prävalenz der Krankheit und Ausprägung der klinischen Symptome werden auf einen Zusammenhang mit den aufgezeichneten Temperaturen im Längsverlauf der untersuchten Flüsse geprüft, um herauszufinden welche Wassertemperaturregime PKD-Ausbrüche bei Bachforellen begünstigen.

Material und Methoden: Im Sommer 2017 wurden zweimal Bachforellen aus den Flüssen Kamp, Ybbs, Traun und Wulka entnommen. Diese wurden einer patho-anatomischen Untersuchung unterzogen, in deren Rahmen Nieren- und Milzgewebe entnommen und mittels PCR auf DNA des Erregers der PKD untersucht wurde. In passend erscheinenden Habitaten wurde nach Moostierchen gesucht. Des Weiteren wurde von Mai bis Oktober die Wassertemperatur im Längsverlauf der Flüsse aufgezeichnet. Die eigenen Messungen wurden durch Temperaturaufzeichnungen von Wasserkraftwerken und hydrologischen Diensten der Länder ergänzt.

Ergebnisse: Es konnten in allen vier Flüssen infizierte Bachforellen nachgewiesen werden; mit Prävalenzen von bis zu 100% in den wärmeren, weiter flussabwärts gelegenen Untersuchungsabschnitten. Die Tiere waren größten-



teils klinisch unauffällig und somit Carrier der Krankheit, die den Entwicklungskreislauf des Parasiten am Leben erhalten. Moostierchenkolonien wurden in jedem Fluss gefunden. Die Suche vor Ort war langwierig und oft nicht erfolgreich. Daher wurde ein auf Wasserproben basierender Nachweis von *Tetracapsuloides bryosalmonae*, dem PKD Erreger, und des Moostierchens *Fredericella sultana* gewählt.

## **Temperatur und PKD abhängige Variationen in Bachforellen in Baden-Württemberg?**

Ros, Albert\*; Timo, Basen; Jan, Baer; Alexander, Brinker

Fischereiforschungsstelle (FFS), Landwirtschaftliches Zentrum Baden-Württemberg (LAZBW), 88085 Langenargen, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Die Proliferative Nierenerkrankung (PKD) ist eine weit verbreitete parasitäre Erkrankung, die hauptsächlich bei Salmoniden auftritt. Sie verursacht Anämie und kann zu erhöhten Mortalitätsraten führen. Laborexperimente haben gezeigt, dass Nierenerkrankungen mit zunehmender Wassertemperatur ansteigen. Hinweise auf temperaturabhängige Mortalität Effekte bei parasitären Infektionen sind jedoch selten. Daten zum Aufkommen der Bachforelle (*Salmo trutta* L.) sowie der Verbreitung des Parasiten in unterschiedlichen Gewässern Baden-Württembergs wurden nun in einer neuen Studie mit georeferenzierten Angaben gekoppelt. Sie zeigt, dass sowohl die Wassertemperatur, als auch geologische Parameter eine hohe Vorhersagekraft für die Verbreitung der Parasiten und dem Grad der Nierenveränderung bei Bachforellen in Baden-Württemberg besitzen. Daten über einen längeren Zeitraum aus einem Fluss deuten jedoch an, dass in naturnahen und thermisch nicht aufgeheizten Gewässern längerfristig die Dichte an Bachforellen auch bei Auftreten des Parasiten nicht abnimmt. Die PKD scheint unter diesen Umständen keinen Einfluss auf die Populationsstruktur zu besitzen. In Gewässerabschnitten hingegen, die für Bachforellen ungünstige Temperaturverläufe aufzeigen (längerfristig im Sommer über 15°C) und in denen ebenfalls der Erreger angetroffen wird, zeigen die vorhandenen Populationsdaten größere Schwankungen und tendenziell abnehmende Fischdichten.

## **Bisher unbekannte Mykotoxine – Welche Gefahr geht von ihnen aus ?**

Constanze Pietsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Zürcher Fachhochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Forschungsgruppe Fish Welfare, Campus Grüental, CH-8820 Wädenswil

### **Zusammenfassung**

Das Vorkommen von Pilzgiften (Mycotoxinen) in der Fischernährung in der Aquakultur ist mittlerweile unbestritten. Jedoch sind mittlerweile etwa 400 unterschiedliche chemische Verbindungen beschrieben worden, die zu dieser Gruppe gehören, und die Liste ihrer möglichen Metabolite wird ebenfalls jedes Jahr durch die fortschreitende Forschung und Analytik immer länger. Die Forschung zu den biologischen Effekten dieser Substanzen hinkt dieser Entwicklung leider hinterher. Insbesondere die Forschung zu den neu beschriebenen Mykotoxinen (sogenannten «emerging mycotoxins») ist daher besonders wichtig, um die Gefahr für Tiere möglichst gut abbilden zu können. Dementsprechend wurden Untersuchungen mit dem Early Life Stage Test mit Zefrabärblingsembryonen durchgeführt, die eine Reihe von toxischen Wirkungen von Mykotoxinen auf die frühe Entwicklung von Fischen zeigen.

### **Summary**

The occurrence of fungal toxins (mycotoxins) in diets for fish is not questioned any more. However, more than 400 different chemical compounds that belong to the group of mycotoxins have been described so far. And the number of fungal metabolites that have been described increases continuously, since research and analytical capacities are increasing. Nevertheless, the research on the biological effects of these substances is not sufficient. Especially, research on newly emerging mycotoxins is important in order to identify a risk for animals as early as possible. Accordingly, the early life stage test with zebrafish embryos was used to show a number of different toxic effects of mycotoxins on the early development of fish.

Zum einen konnte gezeigt werden, dass Ochratoxin die frühe Entwicklung, die Struktur des Herzens und die Schlupfrate von Zefrabärblingsembryonen negativ beeinflusst (Tschirren et al., 2018). Dies ist auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb von den Embryonen zurückzuführen, welches auch der toxischen Wirkungsweise dieses Toxins in höheren Wirbel-

tieren entspricht. Weiterhin wurden mehrere Toxine aus der Gruppe der Enniatine auf ihre Toxizität gegenüber den Fischembryonen überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass insbesondere für Enniatin A eine deutliche Toxizität für die Fischembryonen beobachtet werden. Jedoch konnten die bisherigen Untersuchungen noch keine klaren Hinweise auf die tatsächliche Wirkungsweise von Enniatin A in den Fischen liefern. Weitere Untersuchungen zu der Toxizität der erwähnten Toxine in Fütterungsexperimenten werden daher nötig sein. Die bisher ermittelten jeweils toxisch wirksamen Konzentrationen der Mykotoxine wurden mit den bisher bekannten Konzentrationen in der Umwelt verglichen und somit abgeschätzt, ob ein tatsächliches Risiko für Fische in der Aquakultur erwartet werden kann. Dabei konnte geschlossen werden, dass Ochratoxin vor allem in der Lagerung entsteht und für Fische giftige Konzentrationen innerhalb von wenigen Wochen der Lagerung von Fischfutter auftreten können. Hingegen weisen die bisherigen Erkenntnisse zu Enniatinen darauf hin, dass diese Mykotoxine häufig bereits in bestimmten Rohstoffen für Futtermittel vorkommen, jedoch nicht so stabil zu sein scheinen während des Futtermittelherstellungsprozesses. Daher kann vermutet werden, dass eine Intoxikation mit Enniatinen über das Fischfutter eher unwahrscheinlich ist. Genauere Untersuchungen zu dem Vorkommen und der Toxizität der Enniatine stehen jedoch noch aus.

#### Literatur

Tschirren, L., Siebenmann, S., Pietsch (2018). Toxicity of ochratoxin to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). Toxins 10: 264.

## Vorträge Fish Welfare

## Stress im Fischhirn

Linda Tschirren<sup>1</sup> und Constanze Pietsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zürcher Fachhochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Arbeitsgruppe Fish Welfare, Campus Grüental, CH-8820 Wädenswil

### Zusammenfassung

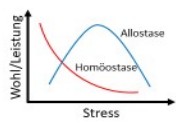
Während die Auswirkungen von Stress im Gehirn beim Menschen immer besser beschrieben werden, sind die genetischen Folgen von akutem und chronischem Dis- und Eustress im Fischhirn weitgehend unbekannt. Als zentrale Verarbeitungsstelle ist es jedoch wahrscheinlich, dass das Gehirn auch bei Fischen sich unter Stress verändert und im Gegenzug auch die Stresswahrnehmung beeinflusst. Um dieses komplexe System zu verstehen, wurde an der Zürcher Fachhochschule für Angewandte Wissenschaften im Rahmen eines grösseren Projekts in einem ersten Schritt die Hirnaktivität in 4 Hirnarealen bei Karpfen nach einem akuten Stressor derjenigen von nicht gestressten Tieren gegenübergestellt. Mittels qPCR wurden die Expressionslevels von verschiedenen IEGs (immediate early genes) sowie weiteren bekannten Stressgenen analysiert. Es zeigt sich, dass nicht nur zwischen den Versuchsgruppen, sondern auch den verschiedenen Hirnarealen Unterschiede bestehen. Dies hat weitreichende Folgen für die weitere Forschung: der Strukturierung des Gehirns und der Funktion der einzelnen Hirnareale muss bei der Suche nach genetischen Folgen von Stress Rechnung getragen werden.

### Summary



While the impact of stress on the human brain is subject of intense research, the genetic effects of acute and chronic dis- and eustress in fish are still rarely explored. It is likely that also in fish the brain is altered by stress and that it in return affects the fish's perception of stress. In order to better understand this highly complex system the Zurich University of Applied Sciences started a research project by comparing the brain activity in 4 brain areas between acutely stressed and unstressed carps. By using qPCR the expression levels of diverse genes such as IEGs (immediate early genes) were quantified. First results indicate differences not only between the treatment groups i.e. stressed vs. unstressed fish, but also between brain areas. This reveals the importance of acknowledging the structuring of the brain as well as the different functions of the brain regions when investigating the genetic effects of stress in the fish brain.

## Stress und Fischwohl

- Homöostase und Allostase



- Eustress und Distress

EAFF Tagung 2018   Stress im Fischhirn

Stress ist ein komplexes und schwer zu definierendes Thema, das seit einiger Zeit an Relevanz gewinnt. Auch in der Aquakultur ist Stress, als Hauptgrund für reduziertes Tierwohl, ein wichtiger Aspekt der Industrie und der Forschung. Stress ist jedoch nicht gleich Stress. Erstens ist ein gewisses Mass an Stress, gemäss dem Konzept der Allostasis (Sterling et al. 1988), dem Wohlergehen zuträglich. Und zweitens ist nicht jeder Stress negativ, positiver Stress (Eustress) fördert das Wohlbefinden (Korte et al. 2007).

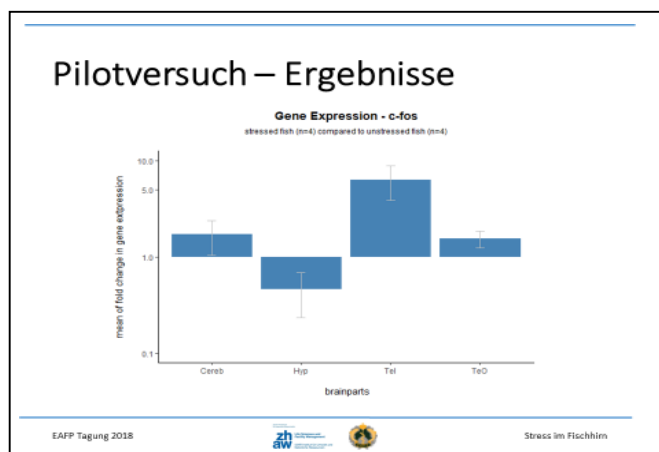


Ein Grossteil der Stressoren wird als erstes vom Hirn verarbeitet, was das zentrale Nervensystem damit zu einem idealen Ort macht, um nach frühen Effekten

von Stress zu suchen. Ein besseres Verständnis der primären Stressantwort eröffnet die Möglichkeit einen Indikator für Stress zu finden, der bisherige Messungen des Tierwohls markant verbessern könnte.



Um die Auswirkungen von Stress auf das Fischhirn besser zu verstehen wurde in einem ersten Schritt die Expression von spezifischen Genen in 4 Hirnteilen bei gestressten und ungestressten Karpfen verglichen. Die gestresste Versuchsgruppe wurde einer Luftexposition ausgesetzt um einen akuten Stress zu induzieren.





Erste Auswertungen der Daten zeigen einen deutlichen Unterschied in der Expression von wichtigen Genen nicht nur zwischen den beiden Versuchsgruppen, sondern auch zwischen den 4 Hirnarealen. Dies zeigt, wie wichtig es ist in Zukunft der Strukturierung des Fischhirns und der Funktion dieser einzelnen Arealen Rechnung zu tragen, wenn es darum geht Effekte von Stress zu untersuchen.

#### **Literatur**

Korte SM, Olivier B, and Koolhaas JM (2007). A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior* 92(3): 422-428.

Sterling P and Eyer J (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: *Handbook of life stress, cognition and health*. New York: Wiley, 1988: 629-649.

## **Klassifizierung des Bewegungs-, Fütterungs- und Sozialverhaltens von Karpfen und Koi bei physiologischen Bedingungen und nach Beeinflussung durch eine Infektion**

Arndt Christian Hofmann<sup>1</sup> und Sven M. Bergmann<sup>1</sup>

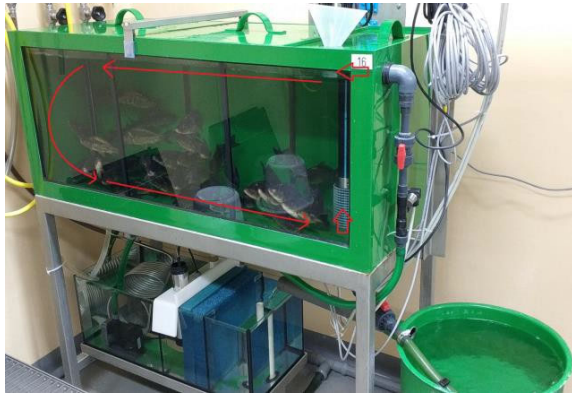
in Kooperation mit den Firmen Promotool, Könnicke Messtechnik, 3 FP GmbH sowie der Humboldt Universität zu Berlin

<sup>1</sup> Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Deutschland

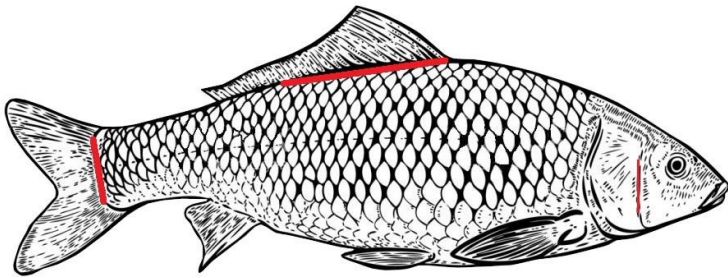
Nachdem 1914 auf der Taishō Ausstellung in Tokyo zum ersten Mal Koi der Weltöffentlichkeit vorgestellt wurden, haben sich diese weltweit verbreitet und sind als Luxustier zu einem Statussymbol der Reichen geworden. Nach und nach entwickelte sich die Koi-Haltung zu einem weit verbreiteten Hobby, auch in Europa. Gemeinsam mit dem Karpfen bilden beide zusammen einen großen Markt mit großem Wert und hohem Wachstumspotential. Zusätzlich bietet der Nutz-Karpfen noch die Möglichkeit auf günstiges und hochwertiges tierisches Eiweiß, welches für eine stetig wachsende Weltbevölkerung, besonders in Entwicklungsländern, immer wichtiger wird. Aus diesen Gründen wäre es sowohl für gewerbliche Produzenten als auch private Halter von Interesse ein System auf den Markt zu bringen, welches bei aufkommenden Gefahren rechtzeitig warnt, damit präventiv prophylaktisch eingegriffen werden kann und Schäden erst gar nicht entstehen.

Mit den Ergebnissen des VITA Check Projektes (ProAnimalLife Network) wird die Überwachungslücke zwischen normalen und verändertem Verhalten geschlossen. Wir möchten ein Verfahren etablieren, welches in der Lage ist, das Verhalten und die Bewegungen von Koi und Karpfen mithilfe von kamera-basiertem Tracking zu überwachen.

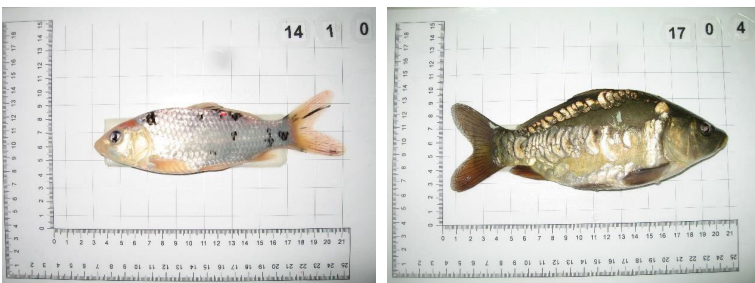
Dazu haben wir einen Tierversuch in vier Becken mit jeweils 37 Fischen, zweimal Karpfen und zweimal Koi, für einen Zeitraum von 18 Monaten eingerichtet. Jeweils ein Karpfen- und Koibecken laufen seit Versuchsbeginn mit konstant 20°C Wassertemperatur, während die anderen beiden Becken sich an den Jahreszeitlichen Temperaturschwankungen im Freiland orientieren.



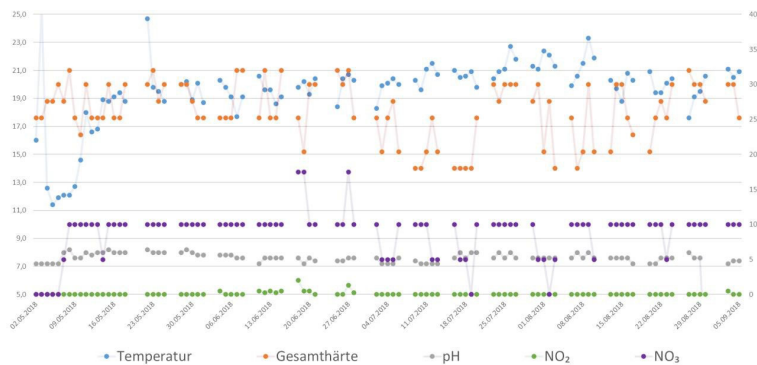
In den ersten 12 Monaten des Versuches gibt es derzeit keine gewollte Einflussnahme und es werden die physiologischen Daten und das Normalverhalten detektiert. Im 13.ten Monat werden alle Fische mit KHV infiziert um eine Noxe zu setzen und damit Stress zu induzieren. Hierdurch kann das veränderte Verhalten untersucht und Abweichungen vom Normalzustand festgestellt werden. Für den Versuch sind jeweils 25 der 37 Tiere pro Becken, die über den gesamten Versuchszeitraum im Becken verbleiben, mit Visible Elastomere Tags (VIE, Northwest Marine Technology) an der Basis von Rücken- und Schwanzflosse und im Gelenkspalt zwischen Operculum und Präoperculum mit einem Dreifarbensystem (rot, gelb, orange, blau) farbig markiert worden. Die gewählten Kennzeichnungsstellen haben sich als diejenigen herausgestellt, bei welchen es den besten Kompromiss und die sinnvollste Kombination zwischen Sichtbarkeit, Applizierbarkeit, Tagloss-Rate und Fischwohl gibt.



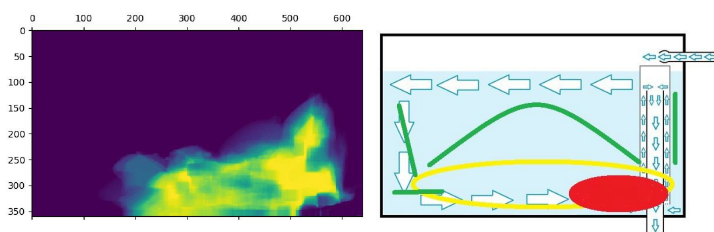
Zusätzlich erhielten sämtliche Fische des Versuchs einen RFID-Transponder, welcher in die Bauchhöhle appliziert wurde, zur einfacheren Handhabung und als zusätzliches Backup-Identifikationssystem der genauen Individualerkennung. Von den 12 Fischen, welche nur per RFID markiert wurden, wird jeden Monat innerhalb der ersten 12 Monate jeweils ein Fisch letal entnommen, um eine Histologie von Kiemen und Haut, als auch ein Leukogramm unter Normalbedingungen zu erstellen. Bei Versuchsende werden dann alle verbleibenden Fische beprobt. Als dritte Identifikationshilfe wurden von allen Fischen Fotokladden erstellt, welche es ermöglichen Veränderungen in Färbung, Schuppenmuster, Form, Größe und sonstigen Individuellen Eigenschaften festzuhalten und bei Bedarf diese mit dem aktuellen Zustand zu vergleichen.



Auf Grundlage eines 127 Tage laufenden Vorversuchs, in dessen Verlauf es zu täglichen Wasserbeprobungen, täglicher Beobachtung und einer 24/7 Aufzeichnung von Videodaten über 92 Tage kam, konnten erste native Verhaltensweisen festgestellt und Videomaterial durch unseren Projektpartner von der Humboldt- Universität Berlin digitalisiert werden. Diese Daten möchten wir nun im Versuch verifizieren, weitere Verhaltensweisen observieren und schlussendlich alles weiter digitalisieren und automatisieren.



Als prägnantestes Ergebnis des Vorversuchs konnte eine gesteigerte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Ablauf- und Bodennähe innerhalb des Versuchsbeckens beobachtet werden. Dort hielten sich die Fische für einen Großteil der Tageszeit auf, während große Teile des Beckens ungenutzt blieben. Als möglicher Hinweis auf veränderte, nicht-physiologische Zustände, ausgelöst etwa durch Stress, aufkommende oder latente Infektionen, könnte dies von Interesse sein.



## **Einfluss von Environmental Enrichment auf das Fischwohl in Speisefischzuchtbetrieben**

Melchior Isler<sup>1</sup>, Beat von Siebenthal<sup>2</sup>, Ioanna Katsiadaki<sup>3</sup>, Heike Schmidt-Posthaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI), Vetsuisse Fakultät, Universität Bern, Schweiz;

<sup>2</sup>Valperca SA, Succursale Percitech, Chavornay, Schweiz;

<sup>3</sup>Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth, United Kingdom

### **Zusammenfassung**

Es besteht ein dringendes Bedürfnis nach wissenschaftlich gestützten Daten, wie Haltungsbedingungen in Fischfarmen verbessert werden können. Die Auswirkungen von Environmental Enrichment auf das Wohlbefinden und die Gesundheit von Speisefischen können dabei als Forschungsfeld dienen. Ziel dieser Studie ist, den Einfluss von visuellem Enrichment bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) unter Aquakulturbedingungen zu untersuchen. Die visuelle Umwelt spielt eine Schlüsselrolle in der neuroendokrinen Entwicklung des Fisches, welche wiederum wichtig ist für Immunkompetenz und Wohlbefinden. Um den Einfluss visueller Faktoren zu testen, werden Fischtanks mit natürlich aussehenden Oberflächen ausgestattet und etablierte Endpunkte zur Erfassung von akutem und chronischem Stress sowie der Fischgesundheit untersucht.

Als Indikatoren von Fischstress werden Wassercortisol, Plasmacortisol und -glucose gemessen, sowie das Differentialblutbild bestimmt. Der Flossenscheiden-Index dient als weiterer Parameter. Mittels pathologischer Untersuchung, inklusive parasitologischer und bakteriologischer Verfahren, wird die Fischgesundheit evaluiert. Wachstum und Konditions-Index der Fische, sowie die bakterielle Wasserbelastung der Tanks werden ebenfalls determiniert. Komplementär zu den genannten Untersuchungen wird das Fischverhalten mittels Videobeobachtungen beurteilt.

Falls die vorgeschlagenen Massnahmen positive Auswirkung auf die Fischgesundheit zeigen, können diese leicht unter Praxisbedingungen angewendet werden. Zudem können die Untersuchungen ggf. als Grundlage für gesetzliche Anpassungen der Haltungsbedingungen in Fischzuchten dienen.

## Summary

There is an urgent need for scientific data to inform if and how welfare conditions can be improved in aquaculture facilities. The impact of environmental enrichment on welfare and health of farmed fish can serve as field of research for that purpose. The aim of this study is to investigate the impact of visual enrichment on the welfare and health status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under aquaculture conditions. Visual environment plays a key role in neuroendocrine development of fish, which in turn regulates important functions such as immunocompetence and welfare. To test the influence of visual enrichment, fish tanks were equipped with natural looking surfaces, and established endpoints are evaluated to examine acute and chronic stress as well as fish health parameters.

As indicators for fish stress water cortisol, plasma cortisol and glucose levels as well as a differential blood cell count are determined. The fin damage index serves as additional parameter to quantify fish welfare. Fish health is evaluated by necropsy, including parasitological and bacteriological examinations. Growth rate, condition index and bacterial load of tank water are determined as well. Complementary, fish behaviour is examined by video observations.

If the proposed method shows positive effects on fish health, it could easily be translated into commercial practice. Furthermore, the research could serve as base for legislative adaptations of husbandry conditions in commercial fish farms.

## Einleitung

Die Erkenntnisse über die kognitiven Fähigkeiten von Fischen haben in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Ihre Wahrnehmung kann oft mit derjenigen von anderen Vertebraten mithalten und die Evidenzlage indiziert, dass zumindest einige Fischarten empfindungsfähig sind (Segner, 2012). In der Folge besteht ein wachsendes Bedürfnis von Konsumenten, Produzenten, Interessengruppen und Behörden, die Haltungsbedingungen in Fischzuchten zu verbessern. Ziel dieser Studie ist es, die Effekte eines visuellen Enrichment auf das Wohlbefinden, die Gesundheit und die Leistung von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) – dem wichtigsten Nutzfisch in der Schweiz – zu untersuchen. Damit soll eine Datengrundlage geschaffen werden, die ggf. als Basis einer Überarbeitung der Haltungsvorschriften von Zuchtfischen dienen kann. Das verwendete Enrichment soll ausserdem leicht in der Praxis anwendbar sein, um eine leichte Umstellung für Fischzüchter zu ermöglichen.

Strukturelles Enrichment kann sensorische und kognitive Stimulation fördern (Allouche, 2002; Angermeier and Karr, 1984; Kihlslinger and Nevitt, 2006; Morice et al., 2013; Näslund and Johnsson, 2016; Salvanes et al., 2013;

Wagner et al., 1995; Wagner et al., 1996). Andererseits steigt die Verletzungsgefahr für die Fische und die Beckenhygiene und Praktikabilität können darunter leiden (Näslund and Johnsson, 2016; Nguyen and Crocker, 2007). In dieser Studie wird auf ein rein visuelles Enrichment zurückgegriffen, um Verletzungsgefahr und Hygieneprobleme zu minimieren, gleichzeitig aber eine komplexe visuelle Umgebung beizubehalten. Eine komplexere Umwelt stimuliert Zellproliferation und kann die kognitiven Fähigkeiten von Fischen erhöhen (Salvanes et al., 2013). Regenbogenforellen haben ein ausgeprägtes Sehvermögen und ihr natürliches Habitat ist im Gegensatz zu künstlichen Zuchtanlagen voller visueller Stimuli (Blaxter, 1970). Auch zeigten Untersuchungen zu unterschiedlichen Tankfarben bereits signifikante Korrelationen zwischen Wachstum, Stresslevel, Aggressionsverhalten und Leistung verschiedener Fischarten (Gaffney et al., 2016; Hoglund et al., 2002; Karakatsouli et al., 2007; Luchiari and Pirhonen, 2008; McLean et al., 2008; Rotllant et al., 2003; Ullmann et al., 2011; Volpato and Barreto, 2001). Darauf aufbauend folgt unsere Arbeitshypothese: Durch die visuelle Imitation einer natürlichen Umgebung soll eine stimulierende sensorische Umwelt geschaffen werden. Dadurch wird eine verbesserte und vermehrte sensorische und kognitive Stimulation erreicht, die zu einer angepassten neuroendokrinen Entwicklung führt. Dies soll das Heranwachsen krankheitsresistenter Phänotypen mit einer höheren Stresstoleranz ermöglichen und so zu verbessertem Fischwohl führen.

### Methoden und Ergebnisse

Die beim Versuch verwendeten Regenbogenforellen stammen aus einer kommerziellen Fischzucht der Schweiz. Beim Einsetzen in die Becken wogen sie im Durchschnitt 20.5 g. Beim Transfer in die Rezirkulationsanlage am FIWI wurden sie gleichmässig auf acht Becken mit jeweils 1 m<sup>3</sup> Wasser verteilt, was in einer initialen Besatzdichte von 12 kg/m<sup>3</sup> resultierte. Sobald eine Besatzdichte von 30 kg/m<sup>3</sup> erreicht war, wurde diese konstant beibehalten. Die acht Becken wurden an Wand und Boden mittels Silikonkleber (CAF® 530, Elkem Silicones Germany GmbH, Lübeck, Deutschland) mit bedrucktem 540 gm<sup>2</sup> PVC-Banner ausgekleidet, vier davon mit einem Motiv von Kiesboden und grösseren Steinen an den Wänden (Abb. 1), und vier Kontrollbecken mit einer grünen Oberfläche.





Abbildung 1:  
Noch leeres Becken mit eingeklebter Enrichment-Folie. Es werden unterschiedliche Motive für Boden und Wand benutzt, um ein natürliches Flussbett zu simulieren.

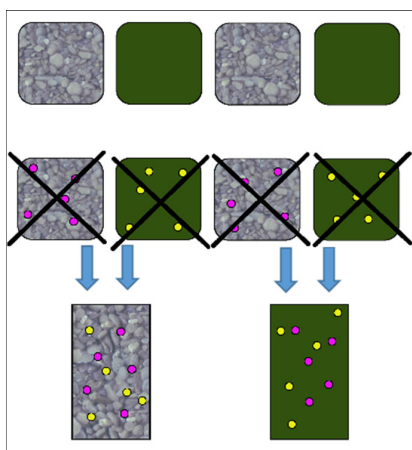


Abbildung 2:  
Fische in vier Becken werden mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Pigmenten markiert. Beim Transfer werden jeweils zwei Becken davon zusammengelegt und auf den Herkunftsbetrieb transferiert. Die Fische aus den übrigen vier Becken bleiben weiterhin in ihrer bisherigen Umgebung.

Nach einer Eingewöhnungszeit wurden in dreiwöchigem Abstand sieben Probennahmen durchgeführt. Danach werden die Fische aus vier Becken in zwei massgefertigte Kästen in die Durchflussanlage des Herkunftsbetriebs zurücktransferiert. Dazu werden Forellen eines Beckens mit Enrichment mit denjenigen eines Kontrollbeckens zusammengelegt – einmal in einen Kasten mit Enrichment und einmal in einen Kontrollkasten (Abb. 2). Vor dem Transport werden die Fische mit fluoreszierendem Pigment markiert (Siebenthal et al., 2017), um bei den folgenden Probennahmen zwischen den jeweiligen Ursprungsbecken unterscheiden zu können (Abb. 2). Die nicht transferierten Fische werden hingegen nicht markiert und weiterhin in ihren Becken am FIWI gehalten. Nach dem Transfer werden im Abstand von vier Wochen sechs weitere Probennahmen am FIWI und auf der Fischzucht vorgenommen.

Bei den Probennahmen wurden zehn Fische pro Becken entnommen, Fischstress und Fischgesundheit wurden evaluiert. Weiterhin wurden jeweils Wasserproben entnommen, Cortisol extrahiert und mittels Radioimmunoassay dessen Gehalt gemessen (Ellis et al., 2013). Aus weiteren Wasserproben wurde der Bakteriengehalt im Beckenwasser bestimmt (3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate, 3M, St. Paul, USA).

Bei den Beprobungen werden die Forellen mit einer gepufferten Ethyl 3-aminobenzoate Methanesulfonat Lösung euthanasiert (MS 222®, Argent Chemical Laboratories, Redmont, USA). Anschliessend werden Länge und Gewicht gemessen sowie der Konditionsfaktor berechnet. Die Flossen werden nach dem makroskopischen Schlüssel nach Hoyle et al. (2007) beurteilt.

Mittels heparinisierten (Liquemin®, Drossapharm AG, Basel, Schweiz) Kanülen wird an der V. cauda Blut entnommen, um die Blutglucose mittels Glucometer zu bestimmen (Accu-Chek® Aviva, Roche Diabetes Care AG, Rotkreuz, Schweiz). Zudem wird ein Blutausstrich angefertigt, um ein Differentialblutbild auszulesen. Der Rest des gewonnenen Blutes wird zentrifugiert, das Plasma eingefroren, um später mittels Radioimmunoassay den Blutcortisolwert bestimmen zu können. Hautabstriche, Kiemen und Darminhalt werden lichtmikroskopisch auf Parasiten untersucht. Von jedem Fisch werden Proben aus Leber, Milz und Niere auf Blutagarplatten (Biomérieux SA, Genf, Schweiz) und auf mit 0.5% Sucrose supplementierten Bromthymolblau-Lactose-Agarplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 22°C für 48 h inkubiert und das Bakterienwachstum ausgewertet. Zudem werden Proben der Kiemen und Milz, sowie von etwaigen Hautläsionen auf Spezial-Agarplatten – die das Wachstum von Flavobakterien begünstigen (Anacker and Ordal, 1959) – bei 15°C für 5 Tage inkubiert.

Ergänzend zu obigen Untersuchungen wird regelmässig das Verhalten der Fische vor und nach dem Füttern gefilmt und ausgewertet.

Der Versuch läuft noch bis Juli 2019 und bisherige Ergebnisse stehen noch zur Auswertung aus.

### **Diskussion**

Durch das Verbringen von Fischen aus Becken mit Enrichment und solchen aus Becken ohne Enrichment in ein neues Becken kann festgestellt werden, ob es bezüglich Anpassung an eine neue Umgebung Unterschiede zwischen den zwei Gruppen gibt.

Plasmacortisol ist als Indikator von Stress in Fischen (und anderen Vertebraten) etabliert. Als Antwort auf akuten Stress synthetisieren interrenale Zellen Cortisol, welches in den Blutkreislauf gelangt (Fabbri and Moon, 2016; Martínez-Porchas et al., 2009; Mommsen et al., 1999; Pickering, 1992). Auch existiert eine nicht-invasive Methode, den Cortisolgehalt im Beckenwasser von Fischzuchtanlagen zu messen (Ellis et al., 2004). Es stellt sich jedoch die

Frage, ob die Messung in einer Rezirkulationsanlage – auch mit Aktivkohlefilter – zuverlässige Ergebnisse liefern kann. Aus diesem Grunde werden beide Methoden vergleichend angewendet.

Plasmaglukose gilt ebenfalls als Indikator von Stress. Akuter Stress führt durch die Ausschüttung von Katecholaminen zu Glykogenolyse und erhöht so den Gehalt an Glucose im Blutplasma (Fabbri and Moon, 2016).

Ein weiterer wichtiger Indikator des Fischwohls ist die Gesundheit, da Stress und damit verbundene erhöhte Cortisolwerte in einer reduzierten Immunfunktion und damit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten resultieren (Pickering and Pottinger, 1985; Segner et al., 2012).

### Literatur

- Allouche S (2002). Nature and functions of cover for riverine fish. Bull. Fr. Pêche Piscic., 297-324.
- Anacker RL, Ordal EJ (1959). Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. II. Bacteriocins. Journal of bacteriology 78, 33-40.
- Angermeier PL, Karr JR (1984). Relationships between Woody Debris and Fish Habitat in a Small Warmwater Stream AU - Angermeier, Paul L. Transactions of the American Fisheries Society 113, 716-726.
- Blaxter JHS (1970). Sensory deprivation and sensory input in rearing experiments. Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen 20, 642-654.
- Ellis T, James JD, Stewart C, Scott AP (2004). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. Journal of Fish Biology 65, 1233-1252.
- Ellis T, Sanders MB, Scott AP (2013). Non-invasive monitoring of steroids in fishes. Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria.
- Fabbri E, Moon TW (2016). Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 199, 74-86.
- Gaffney LP, Franks B, Weary DM, von Keyserlingk MAG (2016). Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Prefer and Are Less Aggressive in Darker Environments. PLOS ONE 11, e0151325.
- Hoglund E, Balm PH, Winberg S (2002). Behavioural and neuroendocrine effects of environmental background colour and social interaction in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). J Exp Biol 205, 2535-2543.

- Hoyle I, Oidtmann B, Ellis T, Turnbull J, North B, Nikolaidis J, Knowles TG (2007). A validated macroscopic key to assess fin damage in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 270, 142-148.
- Karakatsouli N, Papoutsoglou SE, Manoleosos G (2007). Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. *Aquaculture Research* 38, 1152-1160.
- Kihlslinger RL, Nevitt GA (2006). Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology* 209, 504-509.
- Luchiari AC, Pirhonen J (2008). Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 72, 1504-1514.
- Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR, Ramos-Enriquez R (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress?
- McLean E, Cotter P, Thain C, King N (2008). Tank color impacts performance of cultured fish.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Morice S, Pincebourde S, Darboux F, Kaiser W, Casas J (2013). Predator–Prey Pursuit–Evasion Games in Structurally Complex Environments. *Integrative and Comparative Biology* 53, 767-779.
- Näslund J, Johnsson, JI (2016). Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish and Fisheries* 17, 1-30.
- Nguyen RM, Crocker CE, (2007). The effects of substrate composition on foraging behavior and growth rate of larval green sturgeon, *Acipenser medirostris*. *Environmental Biology of Fishes* 79, 231-241.
- Pickering AD (1992). Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125-139.
- Pickering AD, Pottinger TG (1985). Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. *Journal of Fish Biology* 27, 611-619.
- Rotllant J, Tort L, Montero D, Pavlidis M, Martinez M, Wendelaar Bonga SE, Balm PHM (2003). Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 223, 129-139.

- Salvanes AGV, Moberg O, Ebbesson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA (2013). Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280.
- Segner H (2012). Fish Nociception and pain A biological perspective.
- Segner H, Sundh H, Buchmann K, Douxfils J, Sundell KS, Mathieu C, Ruane N, Jutfelt F, Tøften H, Vaughan L (2012). Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 85-105.
- Siebenthal BA, Pompini M, Müller R, Wedekind C (2017). Pros and cons of fluorescent pigment mass marking with different colours: A 5-year long study on grayling (*Thymallus thymallus* L.). *Fisheries Management and Ecology* 24, 173-175.
- Ullmann JFP, Gallagher T, Hart NS, Barnes AC, Smullen RP, Collin SP, Temple SE (2011). Tank color increases growth, and alters color preference and spectral sensitivity, in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 322-323, 235-240.
- Volpato GL, Barreto RE, (2001). Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, 1041-1045.
- Wagner EJ, Ross DA, Routledge D, Scheer B, Bosakowski T (1995). Performance and behavior of cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*) reared in covered raceways or demand fed. *Aquaculture* 136, 131-140.
- Wagner EJ, Routledge D, Intelmann SS (1996). Fin Condition and Health Profiles of Albino Rainbow Trout Reared in Concrete Raceways with and without a Cobble Substrate. *The Progressive Fish-Culturist* 58, Issue 1, 38-42.

## Einfluss von Mikroalgen-Fütterung auf das Wachstum und die Gesundheit von Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Andreas Seitz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften ZHAW, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Forschungsgruppe Fish Welfare, Campus Grüental, CH-8820 Wädenswil

### Zusammenfassung

Fischmehl und Fischöl sind weiterhin wesentliche Fischfutterbestandteile. Es werden jedoch immer mehr Versuche unternommen, nachhaltigere Futtermittel zu produzieren. Im Rahmen studentischer Arbeiten der ZHAW wurden zwei mikroalgenhaltige Futtermittel (Iso/Nanno und Nanno/Porph), sowie ein Kontrollfutter entwickelt, welche in einem neunwöchigen Fütterungsexperiment mit juvenilen Tilapias (*Oreochromis niloticus*) verwendet wurden. Dabei wurde die Futtermittelperformance untersucht, sowie der Gesundheitszustand der Fische anhand histopathologischer Methoden erhoben. Die mikroalgenhaltigen Futtermittel beeinflussten die Fischgesundheit positiv, ebenso wuchsen die Fische signifikant besser ( $p < 0.05$ ) als diejenigen, die das Kontrollfutter erhielten. Durch die Mikroalgenzugabe war auch eine Substitution von Fischmehl und Fischöl in den Futtermitteln möglich. Die verwendeten Mikroalgen scheinen insgesamt gut für die Fischfutterherstellung geeignet zu sein und können durch ihren Zusatz zu einer Qualitätssteigerung beitragen.

### Summary

Today, fishmeal and fish oil still are essential fish feed ingredients. However, more and more attempts are being made to produce more sustainable diets. Within a student project at the ZHAW, two microalgae-containing diets (Iso/Nanno and Nanno/Porph) as well as a control diet were developed. In a nine-week feeding trial, these experimental diets were fed to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). During the experiment, the physical condition of fish was determined by histopathological methods and the growth performance of fish was examined, respectively. The microalgae-containing feeds had a positive impact on fish health and the fish grew significantly better ( $p < 0.05$ ) than those receiving the control feed. The addition of microalgae also allowed the substitution of fishmeal and fish oil in these diets. Overall, the microalgae used in the feeding trial seem to be well suited for fish feed production and their addition can contribute to an increase in diet quality.

Noch immer ist Fischmehl ein wesentlicher Bestandteil von Aquakultur-Futtermitteln. Aufgrund der ansteigenden Nachfrage und Kosten werden jedoch immer mehr Versuche unternommen, um das Fischmehl in diesen Futtermitteln zu ersetzen (Lim & Webster, 2006). Verschiedene Versuche, Fischmehl und Fischöl durch Landpflanzen zu ersetzen, waren jedoch nicht zufriedenstellend, da sie eine andere Nährstoffzusammensetzung hatten und deshalb den Bedarf der Fische an Nährstoffen nur teilweise decken konnten (Lim et al., 2011; Wocher, 2010). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind dabei einer der wichtigsten, aber auch gleichzeitig einer der schwierigsten zu ersetzenden Inhaltsstoffe von Fischmehl und Fischöl, denn sie sind von grosser Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung von Fischen (Sargent et al., 1999). Gemäss Obach (2012) müssen bei Alternativen für Fischmehl und Fischöl gleichzeitig die Fischgesundheit, sowie die Produktionsleistung in Aquakulturen aufrechterhalten werden. Ebenso ist dabei eine adäquate Ernährung essentiell für die Krankheitsprävention (Trichet, 2010). Verschiedene Mikroalgen produzieren unter anderem die gewünschten Fettsäuren und wären dadurch als potentielle Fischfutterzusätze geeignet.

Im Rahmen studentischer Arbeiten der ZHAW wurden aus den Mikroalgen *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis gaditana* und *Porphyridium sordidum* zwei verschiedene Versuchsfutter hergestellt, um damit den Gehalt an Fischmehl und Fischöl im Futter zu reduzieren und sogleich auch den Bedarf an essentiellen Fettsäuren (DHA, EPA und ARA) zu decken. Ebenso wurde ein Kontrollfutter ohne Mikroalgenanteil formuliert. Alle drei Futtermittel wurden so formuliert, dass sie isoproteisch, isolipidisch und isoenergetisch waren. Die beiden mikroalgenhaltigen Futtermittel enthielten dabei je 4 % Mikroalgenanteile, Iso/Nanno mit 2 % *Isochrysis* sp. und 2 % *N. gaditana* Anteil, Nanno/Porph mit 2 % *N. gaditana* und 2 % *P. sordidum* Anteil.

Diese drei Futtermittel wurden danach in einem neunwöchigen Fütterungsexperiment mit juvenilen Tilapias (*Oreochromis niloticus*) verwendet, um die Futtermittelperformance, sowie den Einfluss einer Mikroalgenfütterung auf die Gesundheit der Fische zu untersuchen.

Die Futtermittelperformance wurde anhand diverser Parameter erhoben. Unter anderem durch die Berechnung der Spezifischen Wachstumsrate (SWR), der Aufnahme des Fischgewichts, sowie der Messung der Standardlänge. Der Gesundheitszustand der Fische wurde anhand einer histopathologischen Leber- und Milzbewertung, sowie der Berechnung von zwei organosomatischen Indizes erhoben. Bei der Leber wurden dabei Veränderungen gegenüber dem Normalzustand, mit der Methode von Zodrow et al. (2004) geändert nach Pietsch et al. (2014), untersucht. Bei der Milz wurde

der prozentuale Anteil von Makrophagen-Aggregaten (MAs) am Milzgewebe anhand der open-source Software ImageJ quantifiziert.

Es zeigte sich, dass die Fische, die mikroalgenhaltige Futtermittel erhielten, am Ende des Experiments ein signifikant ( $p < 0.05$ ) höheres Durchschnittsgewicht, eine signifikant höhere SWR, sowie eine signifikant höhere Standardlänge aufwiesen als diejenigen, die das Kontrollfutter erhielten. Bei der histopathologischen Leberbewertung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Futtermitteln festgestellt. Ein Grossteil der untersuchten Fische wiesen mässige bis starke Leberveränderungen bezogen auf den Normalzustand auf. Der häufigste Grund dafür war eine Leberzellverfettung. Die histopathologische Bewertung der Milz zeigte, dass die Fische unter dem Iso/Nanno Futter signifikant kleinere Flächenanteile der MAs im Milzgewebe aufwiesen, als Fische die das Nanno/Porph oder Kontrollfutter erhielten. Dies könnte eine mögliche Entlastung der hämatopoetischen und lymphatischen Funktion der Milz durch *Isochrysis* sp. und *N. gaditana* bedeuten, was zugleich einen positiven Effekt auf das Immunsystem dieser Fische zur Folge hätte. Der Hepatosomatische Index (HSI), wie auch der Splenosomatische Index (SSI) lagen bei allen untersuchten Fischen, verglichen mit Referenzwerten ähnlicher Studien, unabhängig vom Futtermittel, erhöht vor. Der erhöhte HSI, sowie die Leberzellverfettung könnten auf einen Energieüberschuss aufgrund konstanter Überfütterung zurückzuführen sein. Für den erhöhten SSI wäre Stress als mögliche Ursache denkbar. Zu beiden Thesen wären dennoch weitere Untersuchungen nötig. Schlussendlich war durch die Mikroalgenzugabe eine maximale Substitution von 4.8 % Fischmehl und 4.9 % Fischöl in den jeweiligen Futtermitteln möglich.

Insgesamt erzielten die mikroalgenhaltigen Futtermittel einen positiven Einfluss auf das Wachstum und die Gesundheit der Fische. Die verwendeten Mikroalgen scheinen deshalb gut als Fischfutterzusatz geeignet zu sein und können zu einer Qualitätssteigerung beitragen.

#### Literatur

- Lim CE, Webster CD (2006). Nutrient Requirements. Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition: 469–501. The Haworth Press.
- Lim SJ, Kim SS, Ko GY, Song JW, Oh DH, Kim JD, Kim JU, Lee KJ (2011). Fish meal replacement by soybean meal in diets for tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Aquaculture 313 (1): 165–170.
- Obach A (2012). Options and challenges of alternative protein and energy resources for aquafeed. International Aquafeed: 22–25.



- Pietsch C, Schulz C, Rovira P, Kloas W, Burkhardt-Holm P (2014). Organ damage and hepatic lipid accumulation in carp (*Cyprinus carpio* L.) after feed-borne exposure to the mycotoxin, deoxynivalenol (DON). *Toxins* 6 (2): 756–778.
- Sargent J, Bell G, McEvoy L, Tocher D, Estevez A (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177 (1): 191–199.
- Trichet VV (2010). Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41 (3): 356–372.
- Woher H (2010). Überprüfung der Fischart Rutte (*Lota lota* L.) für Zwecke der Speisefischproduktion: 1–115. Niederbayern: Fachberatung für Fischerei des Bezirks Niederbayern.
- Zodrow JM, Stegeman JJ, Tanguay RL (2004). Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 66 (1): 25–38.

**Formatiert:** Englisch (Vereinigtes Königreich)

## **Tierschutzgerechtes Betäuben und Töten von Riesengarnelen *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) – Vergleich von Hypothermie und Elektrobetäubung**

Samek, Chris; Becker, Darius; Hetz, Stefan Karl\*

Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Department of Animal Physiology/Systems Neurobiology and Neural Computation, Philippstrasse 13, 10115 Berlin, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Tropische dekapode Krebse vom „Garnelentyp“ werden zunehmend in Warmwasseraquakulturbetrieben bei Temperaturen um 27°C zur Schlachtreife herangezogen, um möglichst frische Tiere für die Gastronomie anbieten zu können. Dies führt zu einem Konflikt der Interessen von Verbrauchern und dem Tierschutz. Nach geltendem Recht dürfen Krustentiere durch Verbringen in stark kochendes Wasser getötet werden. Eine Betäubung/Tötung durch die Einwirkung elektrischen Stroms ist ebenfalls erlaubt. Das Aufbewahren lebender Krebstiere auf Eis ist verboten.

Für einen Vergleich der Anwendung elektrischen Stromes (Elektrobetäubung bzw. Tötung) sowie Hypothermie (Eiswasser) zur Betäubung/Tötung von *Litopenaeus vannamei* wurden verschiedene sensorische und vegetative Parameter sowie Verhaltensparameter auf elektrische, chemische und thermische Behandlungen in festen Zeitabständen an einzelnen Tieren untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden zur Betäubung und Tötung geeignet sind. Eine Hypothermie führt bei *L. vannamei* schon unter 12°C zu abgeschwächten Reaktionen auf Lichtreize, die sich in verlängerten Reaktionszeiten und Reaktionsamplitude abgenommener Elektroretinogramme äußerten. Aversive Reaktionen waren bei der Abkühlung nicht erkennbar. Unter 10°C waren zudem keine Reaktionen auf mechanische und elektrische Stimulationen messbar. Vegetative Parameter wie Herzschlag und Scaphognathitbewegungen setzen unterhalb dieser Temperaturen dauerhaft aus. Eine Abkühlung auf mindestens 8°C oder darunter führt zur Betäubung und nach wenigen Minuten zum Tod der Tiere. Die Abkühlung kann in Eiswasser innerhalb von 60 bis 90 Sekunden erreicht werden, wie an toten Tieren mit Temperatursonden an verschiedenen Stellen im Körper gemessen werden konnte.

Eine computergesteuerte, in Intervallen von 10 Sekunden erfolgte Elektrobetäubung einzelner Garnelen in genau definierten Betäubungskammern mit Wechselstrom bei 27°C führte nach einer Applikationsdauer von nur 20 Sekunden zu einer schnellen Betäubung und dem Aussetzen von Herzschlag und Atmung für mehr als 10 Minuten. Bereits beim zweiten oder dritten Betäubungsintervall reagierten die Garnelen nicht mehr aversiv mit Kontraktionen des Abdomens was auf eine tiefe Betäubung hinweist. Höhere Betäubungsdosen führten zu längerer Betäubung und zum Tod der Tiere.

Wir schließen aus unseren Untersuchungen, dass beide Betäubungs- bzw. Tötungsverfahren, Hypothermiebehandlung und Elektrobetäubung oder deren Kombination für eine tierschutzgerechte Tötung von *L. vannamei* geeignet sind. Die Vorteile einer unter Laborbedingungen schneller erfolgten Elektrobetäubung bzw. -tötung wird in der Praxis durch die Nachteile der schwerer einzustellenden Betäubungsfeldstärke und die im Betrieb mit Salzwasser komplexeren Anforderungen an die elektrische Betriebssicherheit relativiert. Der Alternative, das Eintauchen der Garnelen in ein Eiswasserbad mit genügend großer Kühlkapazität, stellt eine einfach und sicher zu verwendende Methode dar. Bei der korrekten Verwendung eines Eiswasser-Eis-Gemisches ist die Wirkung auf die Tiere zuverlässig und gleichmäßig. Durch den Verbleib in Eiswasser wird ein ungewolltes Aufwachen der Tiere verhindert. Bis zur Entwicklung modifizierter Elektrobetäubungsgeräte für tropische Garnelen weist nach Meinung der Autoren die Betäubung/Tötung durch Hypothermie Vorteile in der Handhabung und Wirkung auf und sollte derzeit einer Elektrobetäubung vorgezogen werden.

Projekt gefördert mit Mitteln der Europäischen Union und des Freistaates Bayern aus dem Europäischen Meeres-und Fischereifonds (EMFF)

## **Indexmodell zur Bewertung des Tierwohls von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in der Aquakultur (IBETA)**

Becke, Cornelius\*<sup>1</sup>; Müller-Belecka, Andreas<sup>2</sup>; Schumann, Mark<sup>1</sup>;  
Rösch, Roland<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) LAZBW Fischereiforschungsstelle Baden-Württemberg, Deutschland;

<sup>2</sup>) Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow

### **Zusammenfassung**

Mit der stetigen Zunahme der Fischproduktion in Aquakulturanlagen geht eine angeregte öffentliche und wissenschaftliche Debatte zum Thema Tierwohl in der Aquakultur einher. Jedoch stellt sich die Auseinandersetzung mit dem Thema Tierwohl als schwierig dar, da die einzelnen Akteure sehr unterschiedlich an das Thema Tierwohl herangehen und eine feste Definition des „Tierwohls“ fehlt. Oftmals werden einzelne Teilbereiche durch die unterschiedlichsten Akteure betrachtet, die zwar im „Gesamtkomplex Tierwohl“ ihre Berechtigung haben, aber keine umfassende Bedeutung haben. Es fehlen bisher Werkzeuge, die eine einfache, nicht invasive oder an Laborkapazitäten gebundene, umfassende Bewertung des Tierwohls für die praktische Anwendung ermöglichen.

Ziel des Vorhabens ist es, für Fischhalter, Behörden und andere Gremien einen einfach und ohne großen technischen bzw. zeitlichen Aufwand zu bestimmenden Tierwohlindeks für Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in der Aquakultur zu erarbeiten. Die Basis bildet dabei das „Salmon Welfare Index Model (SWIM)“ (Stien et al. 2013). Die verwendeten Tierwohlindektoren des Modells sollen auf einfach ermittelbaren Parametern wie dem äußeren Zustand und dem Verhalten der Tiere bzw. des gesamten Bestandes, sowie ihrer biologischen und physikalischen Umwelt basieren.

Der Erstentwurf des Modells wird in intensiven Diskussionen mit anerkannten Experten aus Praxis, Forschung und Veterinärmedizin optimiert und anschließend in Praxisbetrieben und der hauseigenen Versuchsanlage verifiziert. Die Anpassung des Modells für die Regenbogenforelle soll für eine Haltung in klassischen Durchflussanlagen als aktuell in Deutschland häufigster Haltungsform und zusätzlich auch für Kreislaufanlagen erfolgen. Der Tierwohlindeks ist dabei so angelegt, dass er anhand von zukünftigen Erkenntnissen aus Praxis und Forschung vergleichsweise einfach angepasst und gegebenenfalls auch erweitert werden kann.

Ein erster Entwurf dieses Tierwohlindex für Regenbogenforellen wird vorgestellt.

## Fische und Fütterungsstress – ein molekularbiologischer Ansatz

Seibel, Henrike\*<sup>1</sup>; Schulz, Carsten<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Christian-Albrechts-Universität Kiel, Institut für Tierzucht  
und Tierhaltung;

<sup>2</sup>) Gesellschaft für Marine Aquakultur, Deutschland

### Zusammenfassung

Stressempfindlichkeit ist als eine verminderte Anpassungsfähigkeit des Organismus an physische und psychische Belastungen zu definieren und wird in akuten und chronischen Stress unterteilt.

Eine Ursache für chronischen Stress ist eine inadäquate Ernährung. So kommt es beispielsweise durch den Einsatz von zu viel Sojaprotein in der Ernährung von Salmoniden durch enthaltene antinutritive Inhaltsstoffe zu Durchfallerkrankungen. Wir haben in einem ein-faktoriellen Fütterungsversuch mit drei unterschiedlich hohen Raten, bei denen Fischmehl (50 % in der Diät) gegen Sojaprotein im Futtermittel ausgetauscht wurde (33%, 66%, 100%) die mRNA Expression von verschiedensten potentiellen Stressmarkern im Blut von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) untersucht. Viele Stressforschungen beziehen sich auf die Untersuchung von Organen, wozu die Tötung des Tieres unabdingbar ist.

Bei Stressuntersuchungen im Aquakulturbereich wurden oftmals Standardparameter wie sie von Säugetieren bekannt sind (bspw. TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8, HSP70) als Parameter herangezogen, ohne scheinbar tatsächlich die Art des Stressors zu berücksichtigen. In diesem Versuch hat sich deutlich gezeigt, dass molekulare Stressmarker spezifisch für unterschiedliche Stressarten sein müssen und dass z.B. klassische Hitzestressmarker bei Fütterungsstress nicht beeinflusst sind. Signifikante Unterschiede zwischen der 33% und 100% Soja- Austauschgruppe fanden sich bei ENPP3, MPO, NCCRP1, NOS2, SAA, TLR20, TLR3 und UCP. Hiermit wurden Parameter beschrieben, die sich eher am Ende der chronischen Stresskaskade finden und auch durch entstandene Darmentzündungen mit getriggert wurden.

Es ist bekannt, dass Stressereignisse im Organismus kaskadenartig ablaufen. Übergeordnete Moleküle beeinflussen andere nachgestellte fördernd oder hemmend.

Nun sollte untersucht werden, ob in diesem chronischen Stadium aus densel-

ben bereits untersuchten Blutproben des Fütterungsversuchs derartige allgemeine, übergeordnete Stressparameter gefunden werden können. Diese könnten dann anzeigen, dass Stress überhaupt vorliegt, bevor Untersuchungen zu spezifischen Stressmarkern weitere Hinweise auf die Art des Stressors geben.

Getestet wurde die mRNA Expression von insgesamt 48 Inhibitoren und Faktoren des Inflammasoms, Komplements, Transkriptionsaktivatoren und einige Rezeptorgene.

## **Evaluation von Betäubung und Schlachtung und den damit in Zusammenhang stehenden Tätigkeiten für Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)**

Verena Jung-Schroers<sup>1\*</sup>, Karina Retter<sup>1</sup>, John Hellmann<sup>2</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Abteilung 2 Naturschutz, Landschaftspflege und Fischereiökologie, Fachbereich 26 Fischereiökologie

### **Zusammenfassung**

Es wurden Empfehlungen für Aquakulturbetriebe zur tierschutzgerechten Betäubung und Schlachtung von Regenbogenforellen und Karpfen und der damit verbundenen Tätigkeiten erarbeitet. Für die Erarbeitung wurden 24 Fischhaltungsbetriebe in Deutschland besucht und Prozesse der Betäubung und Schlachtung insgesamt 22-mal für Regenbogenforellen und 17-mal für Karpfen evaluiert.

Um die Belastungen zu minimieren, wird empfohlen, in den Betäubungsbecken regelmäßige Wasserwechsel durchzuführen. Transporte sollten so kurz wie möglich gehalten werden. Regenbogenforellen können mittels Kopfschlag oder elektrischen Strom sicher betäubt werden. Bei Karpfen erreicht man eine sichere Betäubung durch eine Kombination der elektrischen Durchströmung mit einem anschließenden Kopfschlag. Die Leitfähigkeit des Wassers sollte für eine Elektrobetäubung zwischen 600 und 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  liegen und die Dauer der Durchströmung sollte mindestens 2 Minuten, bei Karpfen besser 5 Minuten betragen. Eine sofortige Kontrolle des Betäubungserfolgs sollte unmittelbar nach der Betäubung für jeden Fisch anhand des Augendrehreflexes und des Atemreflexes erfolgen. Nicht ausreichend betäubte Fische sollten sofort per Kopfschlag nachbetäubt werden. Unmittelbar im Anschluss sollte der Blutentzug durch einen beidseitigen Kiemenschnitt oder das Ausnehmen inklusive des Herzens erfolgen. Falls möglich, empfiehlt es sich bei Karpfen zusätzlich das Rückenmark direkt hinter dem Gehirn zu durchtrennen.

### **Summary**

Recommendations have been prepared for aquaculture operations for animal



welfare stunning and slaughter of rainbow trout and carp and related activities. For the preparation, 24 fish farms in Germany were visited and processes of stunning and slaughter were evaluated 22 times for rainbow trout and 17 times for carp. In order to minimize stress, it is recommended to perform regular water changes in the anesthetic covers. Transports should be kept as short as possible. Rainbow trout can be stunned safely by head-blowing or electric current. With carp one achieves a safe stunning by a combination of the electric flow with a subsequent head stroke. The conductivity of the water should be between 600 and 1000  $\mu\text{S} / \text{cm}$  for an electric stunning and the duration of the flow should be at least 2 minutes, for carps it is better 5 minutes. An immediate control of stunning should be done immediately after anesthesia for each fish using the eye-twist reflex and respiratory reflex. Not sufficiently anesthetized fish should be immediately re-stunned by a head stroke. Immediately following the blood withdrawal should be done by a bilateral gill-cut or the excretion including the heart. If possible, it is also advisable in carp to cut through the spinal cord directly behind the brain.

Um Fische während des Betäubens und Schlachtens vor vermeidbaren Belastungen zu bewahren, sollten alle mit der Schlachtung verknüpften Arbeitsschritte, wie die Hälterung, das Sortieren, der Transport zum Schlachtraum sowie die Betäubung und Schlachtung möglichst schonend erfolgen. In dem durch das Bundesministerium für Landwirtschaft geförderten Projekt „Verbesserung des Tierschutzes bei Betäubung und Schlachtung von Regenbogenforellen und Karpfen in Fischzuchten mit unterschiedlichen Vermarktungsstrategien“ wurden Empfehlungen für Aquakulturbetriebe zur tiereschutzgerechten Betäubung und Schlachtung von Regenbogenforellen und Karpfen und der damit verbundenen Tätigkeiten erarbeitet. Für die Erarbeitung dieser Empfehlungen wurden 24 Fischhaltungsbetriebe in Deutschland besucht und Prozesse der Betäubung und Schlachtung von Regenbogenforellen und Karpfen evaluiert.

In den Hälterungsbecken fielen dabei teilweise geringgradig veränderte Wasserwerte auf. Dies führte zu den Empfehlungen die Fische nicht länger als nötig bzw. erforderlich in den Hälterungsbecken zu halten sowie für eine geeignete Wasserqualität zu sorgen. Dies erreicht man zum Beispiel durch Belüftung; Kontrolle der Wasserparameter (z.B. Ammonium / Ammoniak, Sauerstoffgehalt) und regelmäßige Wasserwechsel. Große Temperaturunterschiede sollten vermieden werden. Das Handling der Fische sollte auf das notwendige Maß beschränkt werden, um diese vor Schleimhautverletzungen zu schützen und die Stressbelastung zu reduzieren.

Beim Sortieren sollten die Fische soweit wie möglich im Wasser belassen werden und schonend umgesetzt werden. Beim Transport von der Hälterung zur Betäubung sollten die Fische ebenfalls nach Möglichkeit im Wasser belassen werden und der Aufenthalt an der Luft oder in flachem Wasser sollte so kurz wie möglich sein. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung muss dabei immer gewährleistet sein.

Im Betäubungsbecken sollten regelmäßige Wasserwechsel stattfinden. Diese sollten mindestens einmal täglich und bei Betäubung vieler Fische auch zwischendurch durchgeführt werden. Das Wasser im Betäubungsbecken muss alle Fische und insbesondere deren Köpfe komplett bedecken. Jede Betäubungsmethode muss einen Wahrnehmungsverlust bei Fischen erzielen, der bis zum Eintritt des Todes durch Schlachtung anhält. Ein Wahrnehmungsverlust ist am Ausbleiben von Atemreflex und Augendrehreflex erkennbar. Sowohl Kopfschlag als auch Elektrobetäubung führen bei korrekter Durchführung zum Ausbleiben dieser Reflexe. Beide Methoden sind zulässig und geeignet. Eine Kombination aus Elektrobetäubung und Kopfschlag führt am sichersten zum Ausbleiben dieser Reflexe bis zum Eintritt des Todes.

Bei einer Elektrobetäubung erfolgt die Betäubung aufgrund der Durchströmung des Gehirns mit elektrischem Strom. Bei ausreichend hohen Stromdichten werden Bereiche des Gehirns so beeinflusst, dass keine Wahrnehmung mehr möglich ist. Die Stromdichte wird beeinflusst von der angelegten Spannung und der Leitfähigkeit des durchströmten Objekts (Wasser, Fisch usw.). Eine Elektrobetäubung kann im Wasserbad oder „trocken“ erfolgen. Der Betäubungszustand hält abhängig von der Dauer der Durchströmung unterschiedlich lange an und beeinflusst so die Zeit für die Schlachtung. Im Betrieb wird die Wirksamkeit der Elektrobetäubung beeinflusst durch die angelegte Spannung, die maximale Stromstärke, die Anordnung der Elektroden, die Größe und Form des Betäubungsbeckens, die Leitfähigkeit des Wassers und die Dauer der elektrischen Durchströmung.

Die elektrische Leitfähigkeit gibt an, wie gut Elektrizität durch ein Material fließen kann. Sie wird Mikrosiemens pro Zentimeter [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ] gemessen. Der elektrische Strom wird im Wasser von gelösten Ionen, vorwiegend Salzen, transportiert. Die Leitfähigkeit steigt mit zunehmender Ionenkonzentration und steigender Temperatur. Liegt die Leitfähigkeit im Wasser zwischen 600 und 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , reicht der Ladungstransport bzw. Strom in der Regel aus, um Fische zu betäuben. Bei einer Leitfähigkeit unter 600  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , ist der Strom im Wasser sehr gering. Dadurch ist auch der Ladungstransport im Fisch gering und reicht oft nicht aus, um diesen zu betäuben. Ist die Leitfähigkeit im

Wasser größer als 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , so ist der Ladungstransport bzw. Strom im Wasser deutlich besser als im Fisch. Im Fisch findet demnach ein geringerer Ladungstransport statt, so dass der Strom in großen Teilen um den Fisch herum fließt. Eine Betäubung ist daher möglicherweise nicht gegeben. Die Empfehlung ist daher, die Leitfähigkeit im Wasser des Betäubungsbeckens zwischen 600 und 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  einzustellen. Die elektrische Leitfähigkeit kann bei Bedarf durch Zugabe von Kochsalz erhöht oder durch Verdünnen mit Wasser niedrigerer Leitfähigkeit vermindert werden. Die Kontrolle der Höhe der elektrischen Leitfähigkeit ist dabei immer erforderlich.

Die Elektrobetäubung wird weiterhin beeinflusst durch das elektrische Feld und die Stromdichte im Wasser und im Fisch. Zwischen den Elektroden entsteht ein elektrisches Feld, das an den elektrischen Ladungen zieht und damit den Stromfluss verursacht. Richtung und Stärke des elektrischen Feldes sind abhängig von der Anordnung der Elektroden des Betäubungsgerätes und der angelegten Spannung. Die Stromdichte ist abhängig von der Leitfähigkeit des Wassers und der Stärke des elektrischen Feldes. Die Stärke des Feldes sollte im Becken möglichst homogen sein, damit das Gehirn des Fisches nicht zufällig in einem Gebiet geringer Feldstärke liegt. Das Ziel ist demnach ein möglichst homogenes elektrisches Feld und eine ausreichende Stromdichte im Gehirn des Fisches zu erreichen. Hierfür ist die Form der Elektroden relevant. Die in der Regel an zwei gegenüberliegenden Seiten des Betäubungsbeckens angebrachten Plattenelektroden erzeugen ein homogenes elektrisches Feld. Dabei müssen die Elektrodenplatten die gesamte Beckenseite ausfüllen und vollständig mit Wasser bedeckt sein. Die Betäubung größerer Fischmengen gleichzeitig ist möglich. Beim Einsatz von Stabelektroden ist die Ausbildung eines homogenen elektrischen Feldes abhängig von der Form und der Größe des verwendeten Behältnisses. Geeignet sind i.d.R. nur runde oder ovale Behältnisse mit relativ kleinem Durchmesser. Optimal ist es, wenn der Abstand von der Behälterwand zu einer Elektrode nicht größer ist als der Abstand der beiden Elektroden zueinander. Aus diesen Gründen eignen sich Stabelektroden nur zur gleichzeitigen Betäubung kleinerer Fischmengen.

Sowohl die Betäubung im Wasserbad als auch die Betäubung „trocken“ kann – bei korrekter Durchführung – zu einer erfolgreichen Betäubung der Fische führen.

Die Einwirkung des Stroms soll sofort zu einer Betäubung der Fische führen. Die Dauer der Durchströmung beeinflusst jedoch die Dauer der Wahrnehmungslosigkeit bzw. die Dauer des Erlöschens der Reflexe (= Zeitraum für die Schlachtung). Bei Regenbogenforellen stellte sich eine Durchströmungsdauer von 2 Minuten als am geeignetsten heraus, während Karpfen 5 Minuten

durchströmt werden sollten. Nach jeder Elektrobetäubung muss eine Kontrolle des Betäubungserfolges erfolgen. Die Betäubung mittels Kopfschlag erfolgt durch einen Schlag auf den Schädel über dem Gehirn, wodurch eine Gehirnerschütterung verursacht wird. Bei ausreichender Intensität des Schlags auf die richtige Stelle kommt es zur sofortigen Wahrnehmungslosigkeit. Bei nicht korrekter Durchführung kann der Kopfschlag jedoch zu Verletzungen nicht betäubter Fische führen. Werden Fische per Kopfschlag betäubt, so muss dem Durchführenden die Lage des Gehirns bekannt sein. Diese Betäubungsart eignet sich eher zur Betäubung kleinerer Mengen Fisch; ansonsten wäre ein Wechsel der Person nach einer bestimmten Fischanzahl bzw. die Durchführung mit mehreren Personen zu empfehlen. Auch im Anschluss an den Kopfschlag muss eine Kontrolle des Betäubungserfolges stattfinden.

Wird eine Kombination aus Elektrobetäubung und Kopfschlag durchgeführt, so muss zunächst elektrisch betäubt werden und im Anschluss daran ein Kopfschlag erfolgen. Der Kopfschlag sollte möglichst unmittelbar im Anschluss an die Elektrobetäubung durchgeführt werden. Die Kombination führt zu einem länger andauernden Zustand der Wahrnehmungslosigkeit. Dabei dient der Kopfschlag nach der Elektrobetäubung nicht zur erneuten Betäubung (Fische sind bereits betäubt), sondern zur Verlängerung der Zeitspanne der Empfindungslosigkeit. Das Ziel ist, dass kein Fisch zwischen Betäubung und Eintritt des Todes durch Schlachtung „erwacht“.

Eine Kontrolle des Betäubungserfolges muss nach jedem Betäubungsverfahren sofort im Anschluss an die Betäubung erfolgen. Aussagekräftig zur Kontrolle des Betäubungserfolges sind der Augendrehreflex und Kiemendeckelbewegungen (Atemreflex). Sind Augendrehreflex und/oder Kiemendeckelbewegungen erkennbar, so ist der Fisch nicht betäubt. In einem solchen Fall sollte sofort per Kopfschlag nachbetäubt werden. Es sollte keine weitere Elektrobetäubung durchgeführt werden. Ein Kopfschlaginstrument muss daher immer griffbereit sein.

Die Tötung und Schlachtung muss während der Phase des Wahrnehmungsverlustes stattfinden, und sollte deshalb so schnell wie möglich, im Idealfall unmittelbar im Anschluss an die Betäubung erfolgen. Geeignete Methoden zum Blutentzug sind der Kiemenschnitt (Kiemenrundschnitt), bei dem beidseits die großen Arterien eröffnet werden oder das Ausweiden inklusive des Herzens. Bei Karpfen ist zudem zu empfehlen, nach dem Blutentzug das Rückenmark direkt hinter dem Gehirn zu durchtrennen.

**Literatur:**

Reimers, U. (2008): Untersuchungen zur Elektrobetäubung von Regenbogenforellen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover. Erhältlich unter: [http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/reimersu\\_ss08.pdf](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/reimersu_ss08.pdf)

Retter, K. (2014): Untersuchungen zur Elektrobetäubung von Karpfen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Erhältlich unter: [http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/retterk\\_ss14.pdf](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/retterk_ss14.pdf)

Vorträge: Freie Themen

## **Genetische Erfolgskontrolle der Seeforellenbesatzpraktik im Zürichsee**

Nicola Rhyner<sup>1</sup> und Constanze Pietsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zürcher Fachhochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Arbeitsgruppe Fish Welfare, Campus Grüental, CH-8820 Wädenswil

### **Zusammenfassung**

In der Schweiz werden viele Fischpopulationen durch Besatzmassnahmen künstlich bewirtschaftet. Der Erfolg solcher Besatzmassnahmen ist jedoch nicht immer gewährleistet und unter Umständen können sogar negative Einflüsse auf verbleibende natürliche Populationen damit einhergehen. Daher wird der Besatzerfolg heutzutage vermehrt untersucht, oftmals anhand genetischer Methodik, die auch in vergangenen Studien schon den Misserfolg von Besatzmassnahmen bei verschiedenen Fischarten aufzeigen konnte. Im Rahmen studentischer Arbeiten an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) wird solch eine genetische Erfolgskontrolle des Seeforellenbesatzprogrammes im Zürichsee für die kantonale Fischereiverwaltung des Kantons Zürich durchgeführt.

### **Summary**

Many fish populations in Switzerland are supplemented through stocking. However, the success of stocking often remains unclear and negative effects of stocking on remnant natural populations is possible. Thus, success control of stocking becomes more and more common and is often evaluated by genetic methodology, which repeatedly showed failure of artificial stocking actions in the past. Several student theses at the Zürich University of Applied Sciences (ZHAW) in Wädenswil will conduct such a genetic success control of the stocking of lacustrine trout in Lake Zürich for the office for fisheries of Canton Zürich.

### **Projektskizze**

Der Zürichsee ist ein typischer Alpenrandsee, der durch den Rückzug des Rhein-Linth-Gletschers nach der letzten Eiszeit geformt wurde. Nach starker Eutrophierung im letzten Jahrhundert haben gezielte Massnahmen dagegen Erfolg gezeigt und der See kann heute wieder als mesotroph bezeichnet werden (BAFU, 2016). Im Zürichsee leben zahlreiche Fischarten, von welchen

die Forelle (*Salmo trutta*) im Fokus dieser Studie steht. Sie ist im Zürichsee als potamodrome Lebensform zu finden. Obwohl vielfach als eigene Art beschrieben, stellt sie nach aktuellem wissenschaftlichem Stand nur eine wandernde Lebensform der Bachforelle dar (Kottelat & Freyhof, 2007), welche ihrerseits in den Zürichseezuflüssen auch als residente Lebensform zu finden ist. Aufgrund von Laichwanderungen in diese Zuflüsse ist die Seeforelle auf intakte und durchgängige Gewässersysteme angewiesen, welche die nötigen ökomorphologischen Bedingungen einer natürlichen Reproduktion aufweisen können. Leider können dem viele Zuflüsse des Zürichsees nicht mehr gerecht werden und die Seeforelle hat eine stark beeinträchtigte natürliche Reproduktion. Als Gegenmassnahme wird der Seeforellenbestand im Zürichsee seit langer Zeit mittels künstlicher Besatzmassnahmen gefördert. Die Fischerei- und Jagdverwaltung des Kantons Zürich verfolgt dafür zwei Ansätze. Einerseits werden jedes Jahr während der Laichzeit Wildfänge aus bekannten Aufstiegsgewässern gefangen und künstlich gestreift. Die daraus gewonnenen Brütlinge werden zur Sicherstellung der genetischen Integrität wieder in die gleichen Zuflüsse besetzt. Andererseits wird parallel dazu ein Muttertierstamm aus ehemaligen Wildfängen gehalten, mit dessen Brut primär Bäche mit nicht funktionierendem Aufstieg besetzt werden, die quasi als Aufzucht-bäche gesehen werden können. Gleichzeitig wird das Besatzmaterial der Wildfänge in den Aufstiegsgewässern mit Brütlingen aus dem Muttertierstamm ergänzt. Die Brütlinge werden im Frühjahr vor der ersten Futteraufnahme eingesetzt, so kann ein unnatürliches Fressverhalten aus der Fischzucht verhindert werden. Durch den Besatz erhöhte Jungfischdichten sollen den Druck zur Emmigration in den See erhöhen. Ob diese Muttertierstamm-Sömmerlinge in den Zuflüssen auch konkurrenzfähig sind, ist bisher unbekannt. Die Fischerei- und Jagdverwaltung Zürich hat uns deshalb den Auftrag gegeben, den Erfolg dieses Muttertierstamm-Besatzes im Rahmen studentischer Arbeiten an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) in Wädenswil mittels molekularbiologischer Methodik zu überprüfen. Als genetische Marker zur Untersuchung solcher Verwandtschaftsanalysen werden häufig Mikrosatelliten verwendet. Dabei handelt es sich um hochrepetitive, nicht-codierende DNA-Sequenzen, deren vergleichsweise hohe Mutationsrate Abstammungs- und Populationsanalysen über biologisch sehr kurze Zeitspannen ermöglicht. Mikrosatelliten haben sich in diversen Studien an unterschiedlichen Fischarten in der Schweiz als erfolgreiche genetische Marker bewährt. (Vonlanthen & Hefti, 2016; Vonlanthen, Kreienbühl & Schmid, 2017; Kläfiger, Vonlanthen & Salzburger, 2014, Behrmann-Godel,



2015). Zum Beispiel wurde im Kanton Aargau aus daraus gewonnenen Erkenntnissen das Besatzmanagement der Äschen und Forellen stark angepasst bzw. teilweise ganz eingestellt. Wir werden in unserem Projekt Sömmerlinge, wilde residente und wandernde Forellen und auch Tiere aus dem Muttertierstamm der kantonalen Fischzuchtanlage anhand 20 Mikrosatelliten-Marker genotypisieren, um Verwandtschaftsmuster und genetische Differenzierungen zwischen verschiedenen Populationen zu analysieren.

#### **Literatur**

- Bundesamt für Umwelt BAFU. (2016). Der Zürichsee. Zustand bezüglich Wasserqualität. Faktenblatt.
- Behrmann-Godel J (2015). Genetische Untersuchungen zur Diversität von Seeforellen im Bodensee-Obersee. Zusatzbericht. Internationale Bevollmächtigtenkonferenz für die Bodensee-Fischerei (IBKF).
- Kottelat M, Freyhof J (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
- Kläfiger J, Vonlanthen P, Salzburger W (2014). Populationsgenetische Untersuchungen von Rotaugen in der Limmat. Erfolgskontrolle der Besatzmassnahmen im Stausee Wettingen. Uni Basel und Aquabios GmbH, Auftraggeber: Departement Bau, Verkehr und Umwelt, Sektion Jagd und Fischerei, Kanton Aargau.
- Vonlanthen P, Hefti D (2016). Genetik und Fischerei. Zusammenfassung der genetischen Studien und Empfehlungen für die Bewirtschaftung. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 1637: 90 S.
- Vonlanthen P, Kreienbühl T, Schmid C (2017). Populationsgenetische Untersuchung der Forellen im Kanton Aargau. Aquabios GmbH, Auftraggeber: Departement Bau, Verkehr und Umwelt, Sektion Jagd und Fischerei, Kanton Aargau.

## **Innovative Methoden zur Wasserqualitätsverbesserung in Kreislaufanlagen**

Regazzoni, Luca\*

Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW) Wädenswil,  
Schweiz

### **Zusammenfassung**

Der korrekte Betrieb einer Fischzucht-Kreislaufanlagen (KLA) ist ausschlaggebend für die Gesundheit und die Haltungsbedingungen der Fische.

Typischerweise wird die Art und Weise der Wasseraufbereitung einer KLA – abhängig vom Rezirkulierungs- und Intensivierungsgrad – durch eine Art Kaskadeneffekt bestimmt: als erster Schritt von einer Durchflussanlage zur KLA, wird Sauerstoff der limitierende Faktor für die Besatzdichte sein. Wird die Rezirkulierung weiter erhöht, entsteht eine Anreicherung von Ammonium im Anlagenwasser, welche durch die Implementierung einer Nitrifikationsstufe bekämpft werden kann. Es wird Ammonium zu Nitrat abgebaut, welches sich wiederum im Anlagenwasser anreichert. An der Nitratkonzentration im Anlagenwasser richtet sich somit der nötige Wasseraustausch in der KLA.

Das für die Fische relativ unbedenkliche Nitrat wird, um einen finanziellen Vorteil zu gewinnen, bei möglichst hoher Konzentration im Anlagenwasser beibehalten. Dadurch kann der Wasserverbrauch und damit einhergehend der Wärme- und Salzverbrauch verringert werden. Eine hohe Nitratkonzentration im Anlagenwasser hemmt jedoch die Nitrifikationsreaktion und führt somit zu höheren Ammonium- und Nitrit- Konzentrationen.

Um das Nitrat im Anlagenwasser zu entfernen, kann eine zusätzliche Denitrifikationsstufe implementiert werden. Darin wird Nitrat zu Luftstickstoff ( $N_2$ ) abgebaut. Dadurch kann der Stickstoff nicht nur umgewandelt, sondern effektiv aus dem System entfernt werden. Des Weiteren kann der Einsatz von pH-Kontrollmittel reduziert werden.

Jedoch ist die Denitrifikation in einer KLA nach wie vor schwierig einzusetzen, da oftmals nötige Grundkenntnisse fehlen und ein fehlerhafter Betrieb bei den Fischen zu signifikanter Appetitverminderung bis hin zum Totalausfall führen kann. Zudem ist der Einsatz einer externen Kohlenstoffquelle (z.B. Methanol) kostenintensiv und verlangt die Einhaltung der geltenden Sicherheitsregelungen (z.B. brand- und explosions-sicherer Lagerungsraum). Aus

diesen Gründen ist es für bereits bestehende Betriebe oftmals nicht möglich nachträglich eine Denitrifikationsstufe einzubauen.

An der ZHAW Wädenswil wird an einer Technologie geforscht, welche den internen Schlamm (z.B. eingedicktes Rückspülwasser vom Trommelfilter) als Kohlenstoffquelle für die Denitrifikation nutzbar macht. Die Technologie ist vielversprechend: zusätzlich zu den bestehenden Vorteilen einer klassischen Denitrifikationsstufe soll es möglich sein zu einem grossen Prozentsatz auf externe Kohlenstoffquellen verzichten zu können, während im gleichen Zuge die betrieblichen Kosten und Risiken minimiert werden können.

Eine weitere vielversprechende Technologie, die zurzeit an der ZHAW Wädenswil erforscht wird, besteht in einer kombinierten Phosphatausfällung mit pH-Kontrolle einer KLA. Es wurden bereits vielversprechende Resultate gewonnen, die zeigen, dass mit der Technologie ein grosser Teil des Phosphats aus dem Anlagenwasser entfernt werden kann. Es soll möglich sein die Technologie direkt im Kreislauf der Fischzucht anzuwenden, und nicht, wie bis anhin, nur im Dead-End-Verfahren.

## Molecular characterization of CD4 homologue in brown trout (*Salmo trutta*)

Ashfaq, Hassan\*; Hatem, Soliman; El-Matbouli, Mansour

University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

### Abstract

Brown trout (*Salmo trutta*) belong to the order *Salmoniformes*, and are classed with the family *Salmonidae*. Currently, brown trout exhibits a worldwide distribution, as they have been introduced far outside of their native range. Brown trout is being used by wildlife and forest agencies as an indicator and monitor species for pollution.

Immune system plays vital role in fish such as protection against pathogens, to control outbreaks, response to vaccination and maintaining the sovereignty of health in fish. It consists of innate and adaptive immune system; humoral and cell-mediated machinery. Cell-mediated immunity is governed by T-lymphocyte. T-cells are further divided into cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) and T-helper (Th) cells based on their function. Cluster of differentiation 4 (CD4) is a transmembrane glycoprotein co-receptor of the T-helper cells that interact with major histocompatibility complex class II antigen. CD4 gene is expressed not only by Th cells but also by B- cells; macrophages and granulocytes. Two different CD4 genes (CD4-1 & CD4-2) were already identified in different fish species. Moreover, two subtypes (a and b) of CD4-2 were recognized. However, there is scarcity of information regarding the CD4 genes in brown trout. The present study aims to identify CD4 genes and understand their role in the various immune responses in brown trout.

During this endeavour, spleen tissue was sampled from brown trout in RNAlater and subjected to RNA extraction. After transcription of RNA into cDNA different primer sets targeting conserved regions of fish CD4 different genes were used to amplify brown trout CD4 gene(s). Two different CD4 genes (895 bp & 1052 bp) were amplified. The BLAST search analysis of these sequences revealed 96 % & 92 % identity with 99 % & 92 % Query cover for Atlantic salmon, and rainbow trout CD4, respectively. Rapid amplification of the cDNA ends (RACE) was conducted to get the whole sequence to accurately characterizing these two genes. The amino acid analysis of these genes demonstrated Lck associated motifs, signaling motif in the cytoplasmic tail and both genes encode for two putative Ig-like extracellular domains which are characteristics for CD4 gene. The basal expression level of each

gene will be investigated in brown trout tissues (thymus, spleen, head kidney, gills, and gut). Moreover, the expression level of these two genes in response to viral hemorrhagic septicemia infection will be investigated.

The results of this study will throw lights on the brown trout T- cell immune responses and similarity or difference within its own family.

## **Das Gegenteil von gut ist gut gemeint - „Gut“ desinfiziert in den Tod**

Teitge, Felix\*; Jung-Schroers, Verena; Bauer, Julia; Adamek, Mikolaj;  
Steinhagen, Dieter

Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Die Mikroflora in Fischhaltungssystemen spielt eine entscheidende Rolle für die Gesundheit gehaltener Fische. In den letzten Jahren wurde die Theorie über die Bedeutung mikrobiell gereiften Wassers von verschiedenen Autoren aufgegriffen. Dabei spielt die Tragfähigkeit eines Systems, also die Anzahl Bakterien, die über einen langen Zeitraum in einem System aufrechterhalten werden können, eine entscheidende Rolle. Bakterien können eine k-Selektionsstrategie oder eine r-Selektionsstrategie bevorzugen. K-Selektion findet hauptsächlich in Gemeinschaften statt, die nahe der Tragfähigkeit eines Systems sind, während bei instabilen Umweltbedingungen schnell wachsende Bakterien mit r-Selektionsstrategie überwiegen. In rezirkulierenden Kreislaufanlagen kann dieser Umstand genutzt werden, indem durch die Schaffung stabiler Verhältnisse und die Besetzung aller möglichen Nischen des Systems mit nicht-opportunistischen Bakterien mit k- Selektionsstrategie die Proliferation opportunistischer und damit potentiell pathogener Bakterien mit r-Selektionsstrategie verhindert wird. Das mikrobiell gereifte Wasser wird so durch nicht-opportunistische Bakterien kolonisiert, was Fische vor bakteriellen Erkrankungen schützen kann. Ein hoher Anteil opportunistischer und sich schnell entwickelnder, heterotropher Bakterien hat also häufig negative Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Leistung.

In der Praxis wird nach wie vor häufig versucht, die Gesamtzahl der Bakterien zu reduzieren. Ziel solcher Maßnahmen soll eine Verbesserung der Fischgesundheit sein. Insbesondere auch zur Bekämpfung von Ektoparasiten wird verstärkt auf Wasserhygienisierungsmaßnahmen gesetzt. Dass im Fall einer akuten Infektion Maßnahmen ergriffen werden müssen, ist unbestritten. In Anbetracht der Erkenntnisse zu den Vorteilen eines stabilen Mikrobioms ist jedoch der breite und vor allem präventive Einsatz von Hygienisierungsmaßnahmen kritisch zu hinterfragen.

In vier geschlossenen Kreislaufsystemen wurden die Auswirkungen von UV-Licht, Ozon und verschiedenen Konzentrationen von Peressigsäure auf die bakterielle Mikroflora im System untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Einsatz jeder Wasserhygienisierungsmaßnahme zu einer Beeinflussung der Mikroflora im System führte. Peressigsäure führte bereits in Konzentrationen von 1 mg/l zu einem starken Anstieg der Gesamtkeimzahl. Die Diversität der Bakterien im System nahm zeitgleich ab und eine Selektion hin zu wenigen Spezies sich schnell vermehrender heterotropher Bakterien wurde beobachtet.

Durch Wasserhygienisierungsmaßnahmen kann die Gesamtkeimzahl in einem System nicht sicher gesenkt werden. Es findet vielmehr eine Selektion auf Bakterien mit r-Selektionsstrategie statt. Durch die Destabilisierung der Mikroflora besteht ein erhöhtes Risiko für die gehaltenen Fische an bakteriellen Infektionen durch opportunistische Erreger zu erkranken.

Ähnliche Beobachtungen wie in den beschriebenen Laborversuchen konnten auch in anderen Haltungssystemen beobachtet werden. Dabei war das gewählte Mittel zur Wasserhygienisierung nicht entscheidend. Bei allen Entscheidungen zu Therapie und Hygienisierung sollte der Einfluss auf die Mikroflora bedacht werden. Das gilt insbesondere für den prophylaktischen Einsatz, bei dem die Gefahr durch die Destabilisierung der Mikroflora besonders berücksichtigt werden sollte.

## **Rekombinante Zytokine als molekulare Adjuvantien für Fischimpfstoffe**

Yamaguchi, Takuya<sup>1</sup>; Karger, Axel<sup>1</sup>; Keller, Markus<sup>1</sup>; Dijkstra, Johannes Martinus<sup>2</sup>; Fischer, Uwe<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>) Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Deutschland;

<sup>2</sup>) Fujita Health University, Aichi, Japan

### **Zusammenfassung**

Vakzinen werden zur Verbesserung ihrer Wirksamkeit mit Adjuvantien formuliert. Insbesondere bei parenteral zu applizierenden Fischimpfstoffen kommen Öl-Adjuvantien zum Einsatz, die jedoch wegen ihrer Nebenwirkungen aus Sicht des Tier- und Verbraucherschutzes an Akzeptanz verlieren. Dem Immunschutz vor Infektionskrankheiten liegen in Abhängigkeit von der Erregerart ganz bestimmte Abwehrmechanismen zugrunde. Während bei den meisten bakteriellen Fischseuchen der Immunschutz mit der Bildung von Antikörpern korreliert, scheinen bei viralen Erkrankungen zellvermittelte Immunmechanismen im Vordergrund zu stehen. Viren replizieren ausschließlich intrazellulär, weshalb das Immunsystem Mechanismen entwickelt hat, im Zuge derer virusinfizierte Zellen frühzeitig durch zytotoxische Zellen lysiert werden und somit als Replikationsorte verloren gehen.

In unserem Projekt haben wir uns deshalb die Aufgabe gestellt, solche zellvermittelten Immunmechanismen zu stimulieren und zwar durch gezielten Eingriff in die Signaltransduktion zytotoxischer Zellen.

Hierzu wurden zunächst in einem Säugerexpressionssystem verschiedene rekombinante Zytokine aus der IL-2-Familie hergestellt. Diese Zytokine sind dafür bekannt, bei Säugern natürliche Killer-(NK)-Zellen als Vertreter der angeborenen Abwehr sowie zytotoxische T-Zellen als Vertreter der spezifischen Abwehr zu induzieren. Insbesondere auf das zu dieser Familie zählende IL-15 haben wir aufgrund seiner Rolle bei der Etablierung des immunologischen Gedächtnisses zytotoxischer T-Zellen unser besonderes Augenmerk gerichtet. IL-15 wird bei Säugern bereits kurz nach seiner Synthese intrazellulär an eine Untereinheit seines Rezeptors (IL-15R) gebunden, was seine Stabilität und Wirksamkeit erhöht. Das entsprechende Dimer liegt dann membranständig oder in löslicher Form vor. Deshalb wurden neben einzelnen Interleukinen und Rezeptoren auch entsprechende Heterodimere (IL-15/sIL-15R) hergestellt.



Anhand von in vitro-Studien mit durchflusszytometrisch sortierten Forellenzellen wurde zunächst deren Fähigkeit zur Phosphorylierung der den entsprechenden Interleukinrezeptoren nachgeschalteten Molekülen (hier STAT5) in der Signaltransduktionskaskade getestet. Hierbei konnten die Daten aus der Säugerliteratur weitgehend bestätigt werden.

In Säugerzellexpressionssystemen lassen sich jedoch nur geringe Mengen rekombinanter Zytokine generieren, weswegen eine der nächsten Herausforderungen darin bestand, größere Mengen hochreiner Zytokine und entsprechender Heterodimere mit sIL-15R1 herzustellen. Um nicht das Risiko einer inkorrekten Glykosylierung und Faltung bakterieller Expressionsprodukte einzugehen, wurde ein bakulovirales Expressionssystem gewählt. Auch bakuloviral generierte Zytokine und Zytokin/Rezeptor-Heterodimere waren in der Lage, eine Phosphorylierung von STAT5 zu induzieren und wurden deshalb weiterführend zur in vitro-Stimulierung zytotoxischer Zellen eingesetzt. Unter diesem Zytokinstimulus konnte eine erhöhte zytotoxische Aktivität von Forellenleukozyten gegenüber Mausmastozytomzellen als spezifischen Targets von NK-Zellen festgestellt werden, insbesondere von IL-15/sIL-15R-Heterodimeren.

Diese Ergebnisse zeigen das Potential der von uns hergestellten Zytokine als molekulare Adjuvantien insbesondere für solche Fischimpfstoffe, bei denen die Wirksamkeit auf der Induktion zellvermittelter Immunmechanismen beruht.

Um diese Aussage zu untermauern, fokussieren zukünftige Experimente auf die stimulierende Wirkung von rekombinanten Zytokinen auf zytotoxische T-Zellen, insbesondere bei viralen Infektionen der Forelle.

## **EU-Tiergesundheitsrechtsakt - welche Herausforderungen stehen uns ab 2021 bevor?**

Dirk Willem Kleingeld

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Task-Force Veterinärwesen

### **Zusammenfassung**

Mit dem EU-Tiergesundheitsrechtsakt (Verordnung (EU) 2016/429 - Animal Health Law/AHL), der ab dem 21. April 2021 in allen ihren Teilen für alle EU-Mitgliedstaaten unmittelbar rechtsverbindlich ist, wird die Bekämpfung von Tierseuchen, die bei Land- und Wassertieren auftreten können, in einer Verordnung geregelt.

Die künftigen Bekämpfungsmaßnahmen werden sich nach den Risiken, die mit den gelisteten Tierseuchen verbunden sind, richten. Die Tierseuchen werden im Teil I der Verordnung in fünf Kategorien unterteilt: Kategorie A „unmittelbare Tilgung“, Kategorie B „obligate Tilgung“, Kategorie C „optionale Tilgung“, Kategorie D „Handelsrelevanz“ und Kategorie E „Überwachung“.

Die Koi-Herpesvirus-Infektion wird ab 2021 lediglich der Überwachung unterliegen, während die weiteren gelisteten Wassertierkrankheiten entweder obligat oder optional getilgt werden. Außerdem sieht das AHL in Bezug auf den Gesundheitsstatus keine Beibehaltung der gemäß Richtlinie 2006/88/EG vorgesehenen Kategorie III (keine Infektion bekannt), für aktiv überwachte Kompartimente vor. Eine Beibehaltung des Status „Kategorie III“ im Wege eines delegierten Rechtsakts wird aus deutscher Sicht befürwortet.

Die EU-Kommission hat mit dem AHL die Befugnis erhalten, Durchführungs- und delegierte Rechtsakte (ohne Gesetzescharakter) zwecks einheitlicher bzw. weitergehender Regelung zu erlassen. Einige dieser Rechtsakte müssen bis April 2019 erlassen sein. Erst danach können konkrete Aussagen über künftige Auswirkungen des AHL für die Aquakultur getroffen werden.

### **Summary**

The Animal Health Law (AHL, Regulation (EU) 2016/429), which will become legally binding in its entirety for all EU Member States as from 21 April 2021, contains regulations regarding the control of both terrestrial and aquatic animal diseases.

The future control measures will be based on the risks associated with listed animal diseases. In Part I of the Regulation animal diseases are divided into

five categories: Category A "immediate eradication", Category B "compulsory eradication", Category C "optional eradication", Category D "trade relevance" and Category E "surveillance".

Koi herpesvirus infection will only be subject to surveillance from 2021 onwards, while the other listed aquatic diseases will be either compulsory or optional eradicated. In addition, the AHL does not foresee, in terms of health status, the maintenance of the category III (known as infection) provided for in Directive 2006/88/EC for actively monitored compartments. Maintaining this category III status by means of a delegated act is supported from the German point of view.

With the AHL, the EU Commission has been empowered to adopt implementing and delegated acts (non-legislative) for the purpose of uniform or more far-reaching regulation. Some of these acts must be adopted by April 2019. Only after this time concrete statements can be made on the future impact of the AHL on aquaculture

### **1. Einführung**

Die Verordnung (EU) 2016/429 (EU-Tiergesundheitsrechtsakt - Animal Health Law/AHL) ist am 20. April 2016 in Kraft getreten, jedoch erst ab dem 21. April 2021 anzuwenden. Mit Wirkung ab dem 21. April 2021 wird die "Aquakulturrichtlinie" (Richtlinie 2006/88/EG) aufgehoben.

Mit dem AHL, der ab 2021 in allen ihren Teilen für alle EU-Mitgliedstaaten unmittelbar rechtsverbindlich ist, wird die Bekämpfung von Tierseuchen, die bei Landtieren, Wassertieren oder sonstigen Tieren auftreten können, in einer Verordnung geregelt. Wassertiere im Sinne des AHL umfassen neben Fischen (einschließlich Neunaugen und Schleimaale) auch wasserbewohnende Weich- und Krebstiere.

Die wesentlichsten Elemente der Tierseuchenbekämpfung in der EU wurden zwischen 1988 und 1995 zu einem Zeitpunkt etabliert, wo die EU deutlich weniger Mitgliedstaaten umfasste. Das derzeitige EU-Tierseuchenrecht ist äußerst komplex mit ca. 50 Richtlinien und Verordnungen und weiteren mehrere Hundert weitere Rechtsnormen (Entscheidungen, Beschlüsse). Außerdem gibt es neue Herausforderungen, wie das Auftreten von neu auftretenden („emerging“) Seuchen unter Umständen in Verbindung mit dem Klimawandel.

Die Verordnung dient daher unter anderem der Schaffung eines einzigen transparenten Rechtsrahmens, der Herstellung einer Konsistenz mit anderen Rechtsbereichen wie Tierschutz und Lebensmittelsicherheit, der Stärkung des

Tiergesundheitsniveaus und der EU-weiten Harmonisierung des Tierseuchenbekämpfungsrechts.

Die künftigen Bekämpfungsmaßnahmen sollen sich nach den Risiken, die mit den gelisteten Tierseuchen einhergehen können, richten.

## **2. AHL - Übersicht**

Das AHL umfasst insgesamt 283 Artikel und fünf Anhänge. Die Verordnung gliedert sich in neun Teile:

- Teil I: Allgemeine Bestimmungen
- Teil II: Meldung von Seuchen und Berichterstattung darüber, Überwachung, Tilgungsprogramme, Status „seuchenfrei“
- Teil III: Bewusstsein für Seuchen, Handlungsbereitschaft und Bekämpfung
- Teil IV: Registrierung, Zulassung, Rückverfolgbarkeit und Verbringungen;  
Titel II: Bestimmungen für Wassertiere und deren Erzeugnisse
- Teil V: Eingang in die Union und Ausfuhr
- Teil VI: Verbringung / Einfuhr von Heimtieren zu nicht kommerziellen Zwecken
- Teil VII: Sofortmaßnahmen (Verbringung / Einfuhr)
- Teil VIII-IX: Gemeinsame Bestimmungen; Übergangs- und Schlussbestimmungen

Hinsichtlich der Definitionen ist neu, dass Krebs- oder Weichtiere nur dann als Wassertiere im Sinne des AHL gelten, wenn sie wasserbewohnend sind (Art. 4 Nr. 3). Außerdem definiert sich ein Betrieb künftig als jedes Betriebsgelände bzw. jede Räumlichkeit, Struktur oder im Fall der Freilandhaltung jede Umgebung oder jeder Ort, in der bzw. an dem vorübergehend oder dauerhaft Tiere gehalten werden. Ausgenommen davon sind jedoch Haushalte, in denen Heimtiere gehalten werden sowie Tierarztpraxen oder Tierkliniken (Art. 4 Nr. 27).

Die seuchenspezifischen Bestimmungen zur Prävention und Bekämpfung der Verordnung betreffen neben MKS, KSP, ASP, HPAI und AHS auch die im Anhang II aufgeführten Seuchen. Dort sind auch alle Wassertierseuchen aufgeführt, die derzeit im Anhang IV Teil II der Richtlinie 2006/88/EG gelistet sind.

Die gelisteten Tierseuchen werden mit der Verordnung in fünf Kategorien unterteilt (Art. 9):

- Kategorie A „unmittelbare Tilgung“
- Kategorie B „obligate Tilgung“
- Kategorie C „optionale Tilgung“
- Kategorie D „Handelsrelevanz“
- Kategorie E „Überwachung“.

Tierseuchen der Kategorien A, B oder C sind auch den Kategorien D und E zuzuordnen. Die Zuordnung der Wassertierseuchen erfolgt auf Grundlage der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 (s. unter 3.).

Teil I umfasst ferner Regelungen unter anderem zur Sachkunde der Tierhalter und Zuständigkeiten von Tierärzten und Angehörigen der mit der Gesundheit von Wassertieren befassten Berufe.

Mit Teil II wird insbesondere die Anzeigepflicht, die Durchführung der Überwachung bzw. Tilgung und die Erlangung und Erhalt des Seuchenfreiheitsstatus geregelt. Gesundheitskontrollen haben risikoorientiert zu erfolgen und dienen der möglichen Feststellung gelisteter und neu auftretender Seuchen. Die Überwachung durch die zuständige Behörde zielt auf die Kontrolle der Eigenkontrolle ab. Die Häufigkeit dieser Kontrollen wird nicht vorgegeben. Weitergehende bzw. vereinheitlichende Regelungen zur Überwachung, zu Tilgungsprogrammen und zur Seuchenfreiheit werden über delegierte bzw. Durchführungsrechtakte erfolgen (s. unter 3.).

Mit Teil III des AHL wird das Bewusstsein für Seuchen, die Handlungsbereitschaft und die Seuchenbekämpfung geregelt. Dazu gehört die Erstellung von Notfallplänen. Seuchenspezifische Maßnahmen, z. B. die Bekämpfung von Kategorie A+D+E- oder Kategorie C+D+E-Wassertierseuchen, werden über delegierte Rechtsakte erarbeitet (s. unter 3.).

Teil IV Titel II umfasst insgesamt 53 Artikel, die nur für Wassertiere und für Tiere, die Seuchen auf Wassertiere übertragen können, gelten. Im Kapitel 1 wird die Registrierungspflicht für alle Aquakulturbetriebe (auch für den Zoo-fachhandel) geregelt. Ausnahmen können über Durchführungs-Rechtsakte erlassen werden. Außerdem besteht eine grundsätzliche Zulassungspflicht für Aquakulturbetriebe, von der jedoch Angelteiche, Direktvermarkter und geschlossene Einrichtungen für Zierwassertiere ausgenommen werden können. In weiteren Kapiteln wird unter anderem das Verbringen von Wassertieren innerhalb der Union wie auch mögliche nationale Maßnahmen im Falle von

nicht gelisteten Seuchen (z. B. IPN, SVC, SAV) geregelt. Weitergehende Regelungen zum Teil IV erfolgen ebenso über delegierte Rechtsakte (s. unter 3.).

Teil V umfasst Anforderungen an die Einfuhr von lebenden Tieren und Erzeugnissen. Teil VI befasst sich mit dem Verbringen und der Einfuhr von Heimtieren zu nichtkommerziellen Zwecken und Teil VII mit Sofortmaßnahmen. Die Teile VIII und IX enthalten prozedurale Regelungen und die Übergangs- und Schlussbestimmungen.

### **3. Durchführungs- und delegierte Rechtsakte**

Mit dem AHL erhält die EU-Kommission (KOM) die Befugnis sowohl Durchführungsrechtsakte als auch delegierte Rechtsakte zu erlassen. Obwohl diese Rechtsakte keinen formalen Gesetzescharakter haben, können sie weitgehende Regelungen enthalten.

Durchführungsrechtsakte werden erlassen, wenn einheitliche Bedingungen für die Umsetzung von Vorschriften notwendig sind. Dazu muss KOM vorher einen Ausschuss konsultieren, in dem alle Mitgliedstaaten vertreten sind.

Delegierte Rechtsakte enthalten weitergehende Regelungen, die jedoch die wesentlichen Inhalte des Basisrechtsakts nicht verändern dürfen. Die von KOM vorbereiteten delegierten Rechtsakte werden nach Konsultation von Expertengruppen, in denen alle Mitgliedstaaten vertreten sind, verabschiedet. Es erfolgt im Rahmen dieser Expertensitzungen in Brüssel jedoch lediglich eine Konsultation der Mitgliedstaaten und keine Abstimmung über strittige Inhalte. Nachdem KOM den Rechtsakt verabschiedet hat, haben EU-Parlament und Rat zwei Monate Zeit um Einwände zu erheben.

Mit der delegierten Verordnung (EU) 2018/1629 wurde - wie erwartet - das Epizootische Ulzerative Syndrom (EUS) im Anhang II als gelistete Seuche gelöscht.

Gemäß der Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 werden die EHN, Infektionen mit *M. mackini* und *P. marinus*, das Taura-Syndrom (TS) und die Yellowhead Disease (YHD) als Kategorie A+D+E-Seuche kategorisiert. Während diese Einstufung für die EHN, das TS und die YHD noch nachvollziehbar ist, ist sie für die Weichtierseuchen weiterhin zu hinterfragen. Im Rahmen der Expertensitzungen zu den delegierten Rechtsakten zu Teil III des AHL wurde seitens vieler Mitgliedstaaten wiederholt darauf hingewiesen, dass eine Tilgung von Weichtierseuchen in natürlichen Weichtierzuchtgebieten in der Regel nicht möglich ist. VHS, IHN, ISA (HPR-del), Infektionen mit *B. exitiosa*, *B. ostreae* und *M. refringens* und WSD (Infektion mit WSSV) werden in die Kategorie C+D+E eingestuft. Die KHV-I wird als E-Seuche

kategorisiert und wird somit ab April 2012 lediglich überwacht. Deutschland hat sich mit seiner Empfehlung der C+D+E-Kategorisierung für KHV-I nicht durchsetzen können, obwohl Erfolge der KHV-I-Bekämpfung nicht von der Hand zu weisen sind. Nicht nachvollziehbar ist, dass mit Ausnahme von Ungarn weitere mittel- und osteuropäische MS eine C+D+E-Kategorisierung nicht unterstützen. Unter Bezugnahme auf die o. g. Hinweise muss auch hier weiterhin die C+D+E-Listung der Weichtierseuchen hinterfragt werden.

Die Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882 enthält unter „Gelistete Arten“ auch eine Auflistung „Arten“ (empfindliche Arten) und „Vektorarten“. Für KHV-I werden erstmals Vektorarten (Goldfisch, Graskarpfen) gelistet. Auch bei den anderen Wassertierseuchen erfolgten Ergänzungen. So gelten in Bezug auf die VHS der Amerikanische Saibling ab April 2021 als empfindliche und der Bachsaibling als Vektorart. Die vorgenommenen Ergänzungen sind aus hiesiger Sicht noch nicht vollständig und entsprechen nicht grundsätzlich dem wissenschaftlichen Kenntnisstand.

Weitere delegierte Rechtsakte befinden sich (Stand: Januar 2019) noch im Konsultationsstadium. Dazu gehören die delegierten Rechtsakte zu Teil II des AHL (Überwachung, Tilgung, Seuchenfreiheit), zu Teil III (Bekämpfung Kategorie A+D+E-Seuchen), zu Teil IV (Registrierung und Zulassung von Betrieben, Verbringung) und Teil V (Einfuhr). Einige delegierte Rechtsakte müssen jedoch bis April 2019 verabschiedet werden. Die Diskussionen im Rahmen der von KOM einberufenen Expertensitzungen in Brüssel zeigen jedoch ein sehr uneinheitliches Meinungsbild zwischen den Mitgliedstaaten und KOM und auch zwischen den Mitgliedstaaten untereinander. An den Beratungen nehmen im Übrigen auch die EFTA-Mitgliedstaaten Norwegen und die Schweiz teil.

Deutschland und auch weitere Mitgliedstaaten kritisieren den möglichen künftigen Umgang mit Aquakulturbetrieben, die zwar nicht als infiziert gelten, jedoch den Status „seuchenfrei“ aus hydro-geografischen, betrieblichen und / oder wirtschaftlichen Gründen nicht erreichen können. Das AHL sieht für Mitgliedstaaten, Zonen oder Kompartimenten grundsätzlich nur drei Gesundheitskategorien vor: „seuchenfrei“, „Tilgung zur Erlangung der Seuchenfreiheit“ und „nicht seuchenfrei oder Gegenstand einer Tilgung“. Demnach würden Betriebe, die nach derzeitiger Rechtslage als Kategorie III-Betriebe (keine Infektion bekannt, aktive Überwachung) gelten, künftig mit Betrieben der Kategorie V (infiziert) in einer Kategorie zusammengefasst. Auch weil sich die bisherige Kategorisierung hierzulande durchaus bewährt hat und eine Zusammenführung der Kategorien III und V dem Ziel des AHL (Seuchenbekämpfung und -vorbeugung) widerspricht, haben sich viele Mitgliedstaaten für eine Beibehaltung der bestehenden Abgrenzung der Kategorien III und V

ausgesprochen. Zusätzliche Sicherheiten, z. B. eine risikoorientierte und gezielte Überwachung (Probenahmen) zugelassener Aquakulturbetriebe, können Bedenken von Mitgliedstaaten wie Dänemark oder Spanien unter Umständen ausräumen. Ob, z. B. über einen delegierten Rechtsakt, der Status „Keine Infektion bekannt“ zur Abgrenzung von „infiziert“ erhalten werden kann, war zum Redaktionsschluss noch nicht bekannt.

#### **4. Fazit und Ausblick**

Ein wichtiges Ziel des AHL ist sicherlich, den Anteil der seuchenfreien Aquakulturbetriebe deutlich zu vergrößern. Mit Blick auf die Ausgangssituation in Deutschland und in anderen mitteleuropäischen Ländern ist jedoch festzustellen, dass der weitaus größte Teil der Betriebe als Kategorie III-Betriebe (keine Infektion bekannt) eingestuft ist. Der Anteil tatsächlich infizierte Betriebe ist jedoch sehr gering. Aufgrund der hierzulande häufig kleinbäuerlichen Betriebsstruktur, der hydro-geografischen Gegebenheiten, der rechtliche Einschränkungen (Wasserrahmenrichtlinie) und der wirtschaftlichen Perspektiven ist es fraglich, ob viele Aquakulturbetriebe den Schritt „Tilgung“ zwecks Erlangung des Seuchenfreiheitsstatus machen werden oder können. Eine Beibehaltung der bisherigen Abgrenzung zwischen infizierten Betrieben und Betrieben, für die keine Infektion bekannt ist, ist aus fachlicher Sicht für die Gesunderhaltung der Wassertiere und zur Vermeidung eines Wettbewerbsvorteils für seuchenfreie Mitgliedstaaten unerlässlich.

Der Schutz des Seuchenfreiheitsstatus und gleichzeitig des Binnenmarkts scheint für KOM absolute Priorität zu haben. Die bisherigen Expertenkonsultationen zu den zu erlassenden delegierten Rechtsakten in Verbindung mit dem AHL belegen die uneinheitlichen Auffassungen der Mitgliedstaaten und KOM. In dem Zusammenhang ist jedoch festzustellen, dass die Aquakulturwirtschaft beispielsweise in Dänemark nicht mit der Aquakulturwirtschaft in anderen Mitgliedstaaten wie Deutschland vergleichbar ist. Zurecht muss die Frage gestellt werden, ob der künftige Rechtsrahmen mit Blick auf die Seuchenfreiheit sich nur für die „industriemäßige Aquakulturwirtschaft“ und nicht für die kleinbäuerliche, aus sozio-kultureller Sicht schützenswerte Teichwirtschaft eignet.

Die fortgeführte Listung von Weichtierseuchen in den Kategorien „A+D+E“ und „C+D+E“ ist fachlich nicht nachvollziehbar. Im Zuge der Umsetzung der Richtlinie 2006/88/EG hat sich eindeutig herausgestellt, dass diese Seuchen in natürlichen Weichtierzuchtgebieten nicht getilgt werden können. Eine Handelsrelevanz mit Drittländern bzgl. Besatztiere („Muschelsaat“) ist nur bedingt gegeben. In dem Zusammenhang kann die Entscheidung der Herabstufung der KHV-I überhaupt nicht nachvollzogen werden, da Erfolge der auf



Grundlage der Richtlinie 2006/88/EG erlassenen Seuchenbekämpfungsmaßnahmen durchaus belegbar sind.

Welche Herausforderungen ab 2021 tatsächlich auf die Aquakulturwirtschaft und die Überwachungsbehörden zukommen werden und ob es auf nationaler Ebene weitergehender Regelungen bedarf, wird sich erst nach Erlass aller delegierten und Durchführungsrechtsakte zum AHL herausstellen. Ein (behördlicher) Mehraufwand lässt sich jetzt aber schon vermuten. Daher muss das Erreichen der AHL-Ziele „Transparenz, bürokratische Verschlinkung und Vereinfachung von Vorschriften“ grundsätzlich in Frage gestellt werden.

#### **Zitierte Rechtsnormen (chronologisch)**

**Richtlinie 2006/88/EG** des Rates vom 24. Oktober 2006 mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnisse und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten; ABl. L 328 vom 24.11.2006, S. 14-56

**Verordnung (EU) 2016/429** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“); ABl. L 84 vom 31.03.2016, S. 1-208

**Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629** der Kommission vom 25. Juli 2018 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“); ABl. L 272 vom 31.10.2018, S. 11-15

**Durchführungsverordnung (EU) 2018/1882** der Kommission vom 3. Dezember 2018 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen; ABl. L 308 vom 04.12.2018, S. 21-29

**Literaturquellen können beim Autor angefordert werden**

## Antivirale Wirkungen von 25 Hydroxycholesterin in Fischzellen

Adamek, Mikolaj<sup>\*1</sup>; Davies, Jonathan<sup>2</sup>; Beck, Alexander<sup>3</sup>; Jordan, Lisa Katharina<sup>3</sup>; Becker, Anna Maria<sup>3</sup>; Matras, Marek<sup>4</sup>; Reichert, Michal<sup>4</sup>; Way, Keith<sup>5</sup>; Zou, Jun<sup>6</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;

<sup>2</sup>) School of Life Sciences, Keele University, UK;

<sup>3</sup>) Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland;

<sup>4</sup>) Laboratory of Fish Diseases, National Veterinary Research Institute, Poland;

<sup>5</sup>) Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, UK;

<sup>6</sup>) National Pathogen Collection Center of Aquatic Animals, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, China

### Zusammenfassung

Cholesterin ist essentiell für den Aufbau und die Aufrechterhaltung von Zellmembranen, ist der Hauptbestandteil von „Lipid Rafts“ in den Zellmembranen und moduliert dadurch die Membranfluidität. Deshalb ist Cholesterin für mehrere Schritte im viralen Replikationszyklus von entscheidender Bedeutung, insbesondere für behüllte Viren. In Säugetierzellen führen Virusinfektionen zur Induktion des Oxysterols 25 Hydroxycholesterol (25HC), ein löslicher antiviraler Faktor, der durch Aktivierung des Enzyms Cholesterin-25-Hydrolase (CH25H) aus Cholesterin erzeugt wird. Die Beteiligung von CH25H an Immunreaktionen wurde bei Fischen bisher kaum untersucht. Daher wurden in unserer Studie mutmaßliche Gene, die für CH25H kodieren, identifiziert und von Karpfen und Regenbogenforellen kloniert. Außerdem wurde eine HPLC-MS-Methode zur Messung der Konzentration von Oxysterolen in Fischzellen etabliert. Unsere in vitro Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von CH25H eine antivirale Reaktion gegen ein sehr breites Spektrum von Viren sowohl in Karpfen- als auch in Regenbogenforellenzellen darstellt. Darüber hinaus wird die ch25h-Expression bei Karpfen auch in vivo während Virusinfektionen moduliert. HPLC-MS-Analysen zeigten, dass selbst Fibroblastenzellen 25HC und seinen Metaboliten 7a, 25diHC produzieren können. Für 25HC konnte eine antivirale Aktivität nachgewiesen werden. Es blockierte den Eintritt von cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), aber nicht von spring viremia of carp virus (SVCV) und common carp paramyxovirus (CCPV) in KFC-Zellen sowie den Eintritt des viral haemorrhagic septicaemia

virus (VHSV) und des infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in RTG-2-Zellen. Die Stimulation von RTG-2-Zellen mit rekombinantem IFN Typ I von Regenbogenforellen lieferte weitere Beweise dafür, dass trotz der Tatsache, dass die auf CH25H basierende antivirale Reaktion mit der Typ-I-IFN-Antwort korreliert ist; sie nicht von IFN- Typ I abhängt. Interessanterweise begegnet CyHV-3 seine Verwundbarkeit durch 25HC damit, dass die ch25h-Genexpression in Karpfenfibroblasten während einer CyHV-3-Infektion herunterreguliert wird.

## MALDI-TOF MS Identifizierung von bakteriellen Erregern

Marcel Erhard<sup>1</sup> & Falk Wortberg<sup>2</sup>

<sup>1</sup> RIPAC-LABOR GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam-Golm

<sup>2</sup> Tierärztliche Praxis für Fische, Friedensweg 5, 57462 Olpe

### Zusammenfassung

Die MALDI-TOF MS Methode hat sich in den letzten 10 Jahren in den meisten mikrobiologischen Laboren robust etabliert. Die Methode zur Identifizierung der Bakterien und Pilze ist jedoch nur so gut, wie die verwendete Datenbank. Die kommerziellen Systeme mit ihren Datenbanken sind hauptsächlich auf klinische Diagnostik mit Erregern von Mensch, Schwein, Rind und Wirtschaftsgeflügel ausgerichtet. Für die Identifizierung von Fischpathogenen muss deshalb größtenteils selbst eine Referenzdatenbank erstellt und die Methode validiert werden. Das RIPAC-LABOR baut seit einigen Jahren diese Referenzdatenbank auf und kann somit viele bekannte und neue Spezies identifizieren bzw. unterscheiden. Diese eindeutige Identifizierung ist für den nächsten Schritt der Herstellung eines bestandsspezifischen Impfstoffes wichtig. Neben den klassischen Spezies von *Aeromonas* und *Yersinia*, konnten so viele weitere Referenzspektren von *Aliivibrio*, *Carnobacterium*, *Cedecea*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Deefgea*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Iodobacter*, *Listonella*, *Morganella*, *Edwardsiella*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella* und *Vibrio* in der Datenbank angelegt werden. Die Herausforderung besteht in der Handhabung der vielen neuen und noch unbekannten Spezies. Viele Sequenzierungen mittels 16S rRNA zeigen keine verwertbaren Homologien mit mehr als 98-99% Übereinstimmung zu bekannten Spezies. Der Vortrag zeigt anhand einiger Beispiele aus unserer Routine solche interessanten und teilweise unerwarteten Identifizierungsergebnisse.

### Summary

The MALDI-TOF MS method was established robustly in most microbiological laboratories over the last 10 years. However, the method for identifying bacteria and fungi is only as good as the used database. The commercial reference database is mainly focused on clinical diagnostics with pathogens from humans, pigs, cattle and poultry. For the identification of fish pathogens, a reference database has to be established and validated. The RIPAC-LABOR has been building this reference database for several years and is able to identify and distinguish known and new species. This exact identification is important for the next step in the production of the autogenous vaccines. Besides the classic species of *Aeromonas* und *Yersinia*, additional other reference

spectra of *Aliivibrio*, *Carnobacterium*, *Cedecea*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Deefgea*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Iodobacter*, *Listonella*, *Morganella*, *Edwardsiella*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella* und *Vibrio* were established in the reference database. The handling of many new and still unknown species is the aim of the work. Unfortunately, many sequencing results of 16S rRNA shows no similarities with more than 98-99% homology to known species.

#### **MALDI-TOF MS Methode**

Bei der MALDI-TOF MS Technologie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight - Mass Spectrometry) wird von den einzelnen Bakterien ein unverwechselbares Proteinspektrum aufgenommen, an dem es jederzeit identifiziert werden kann. In der Regel erfolgt die Analyse und Probenvorbereitung von Agar-Platten. Dabei werden  $\sim 10^6$  bis  $10^7$  Zellen auf den MALDI-Probenträger übertragen und mit der Matrix gemischt. Die Matrix extrahiert die Moleküle der Zelle und beim Verdampfen des Lösungsmittels bilden sich Matrix-CoKristalle mit den Biomolekülen der Zellen. Bei der Ionisation durch einen Laserbeschuss im Gerät, werden dann viele Biomoleküle größtenteils intakt in die Gasphase überführt und teilweise geladen. Im anschließenden Beschleunigungsprozeß werden die positiv geladen Moleküle (meist Proteine) in Abhängigkeit ihrer Masse unterschiedlich beschleunigt. Nach einer freien Driftstrecke treffen die Ionen dann zeitverzögert auf den Detektor. Über eine Kalibrierung kann den Flugzeiten dann Massen zugeordnet werden. So erhält man das sog. Massenspektrum der Zellen. Sämtliche Geräte- und Matrixparameter sind dabei so gewählt, dass hauptsächlich die kleineren Proteine zwischen 3.000 und 20.000 Da der Zelle detektiert werden. Das Massenspektrum wird dann automatisch gegen eine Referenzdatenbank mit bekannten Spezies verglichen. Liegt eine ausreichende Übereinstimmung der Proteinmuster vor, kann die Spezies identifiziert werden.

Ist ein Spektrum für die Datenbank unbekannt, kann der Stamm mittels 16S rRNA sequenziert und identifiziert werden. Bei einer eindeutigen Zuordnung zu einer validen Spezies wird in der Regel die Spezies mit den neuen Massenspektren als neue Referenz in die MALDI-TOF MS Datenbank eingepflegt.

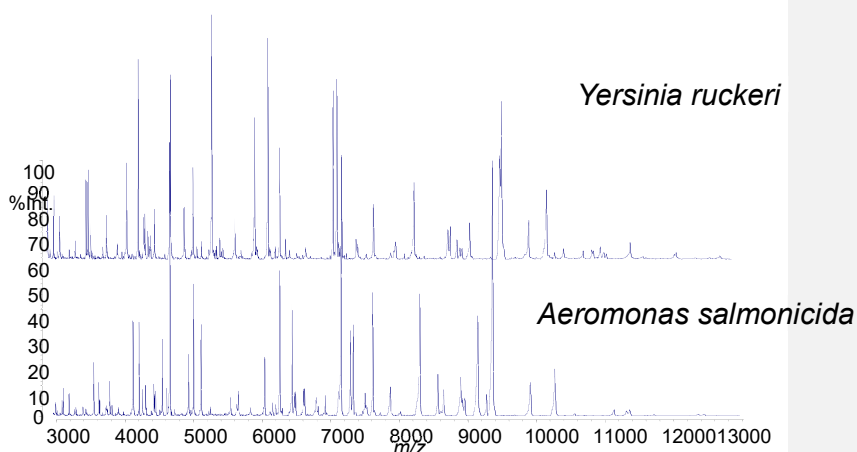


Abbildung 1: MALDI-TOF Massenspektren von 2 unterschiedlichen Bakterien

#### Identifizierung pathogener Spezies bei Fischen

Die verfügbaren kommerziellen Referenzdatenbanken enthalten kaum fisch-pathogene Spezies. Deshalb wurde in unserem Labor begonnen, fischrelevante Spezies in der Referenzdatenbank zu hinterlegen. Dabei konzentrierten wir uns auf frische Neuisolat (siehe Auflistung oben) von Salmoniden. Als Beispiel sei hier *Deefgea* (siehe Abbildung 2) gezeigt. Neben bekannten, validen Spezies werden meist neue, unbekannte Isolate gefunden, deren 16S rRNA Sequenz keiner bekannten Spezies zugeordnet werden kann. Diese Referenzspektren können ebenso mit "Arbeitsnamen" in der Referenzdatenbank hinterlegt werden.

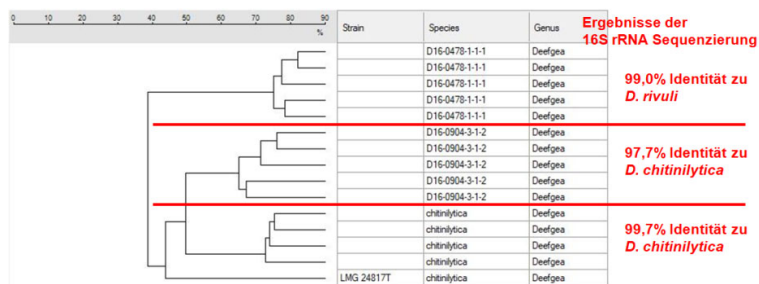


Abbildung 2: Clusteranalyse von MALDI-TOF Massenspektren von unterschiedlichen Deefgea-Isolaten mit ihren 16S rRNA Sequenzhomologin.

Die meisten unbekannten Isolate werden im Bereich der Gattung *Flavobacterium* gefunden. So haben wir derzeit in unserer Datenbank ~20 potentiell unterschiedliche, unbekannte Spezies.

#### **Trennung und Identifizierung von eng-verwandten Spezies**

Beim Aufbau der MALDI-TOF MS Referenzdatenbank zeigte sich, dass oft valide Spezies sehr eng mit einander verwandt sind. Als Beispiel sei hier die Gruppe von *Aeromonas salmonicida*/*bestiarum* und deren eng-verwandte Spezies zu nennen. Laut 16S rRNA Datenbank (LPSN, EzBioCloud's) haben folgende Spezies eine signifikante Sequenzhomologie mit >99,0% zu *Aeromonas bestiarum* ATCC 51108T:

- 100,0% *H. piscium* (*A. salmonicida* subsp. achromogenes) CIP 106116T
- 100,0% *Aeromonas piscicola* LMG 24783T (2010 fish disease)
- 100,0% *Aeromonas salmonicida* subsp. masoucida NBRC 13784T
- 100,0% *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes NCIMB 1110T
- 100,0% *Aeromonas salmonicida* subsp. pectinolytica
- 99,86% *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida ATCC 33658T
- 99,59% *Aeromonas molluscorum* (2004 bivalve molluscs)
- 99,59% *Aeromonas salmonicida* subsp. smithia CCM 4103T
- 99,52% *Aeromonas aquatica* (2015 waters associated with blooms)
- 99,52% *Aeromonas rivuli* DSM 22539T (2011 karst water rivulet)
- 99,48% *Aeromonas encheleia* LMG 16331T (1995 European eels)
- 99,39% *Aeromonas popoffii* CIP 105493T (1997 drinking water plants)

Durch diese enge Verwandtschaft ist eine eindeutige Bestimmung der Spezies mit MALDI-TOF MS und der 16S rRNA Sequenzierung schwierig. Die Trennung oder Identifizierung muss deshalb hier durch zusätzliche Tests mittels Biochemie, Spezialmedien und PCR's erfolgen.

#### **MALDI-TOF MS Typisierung von *Yersinia ruckeri* Biotypen**

In Einzelfällen gelingt mit der MALDI-TOF MS eine Typisierung von Bakterienspezies. So kann anhand einer spezifischen Masse (Peak  $m/z = 9325$ , siehe Abbildung 2) in einem zweiten Schritt der Biotyp 1 nachgewiesen werden. Die Referenzbestimmung erfolgte nach Romalde et al. 1993.

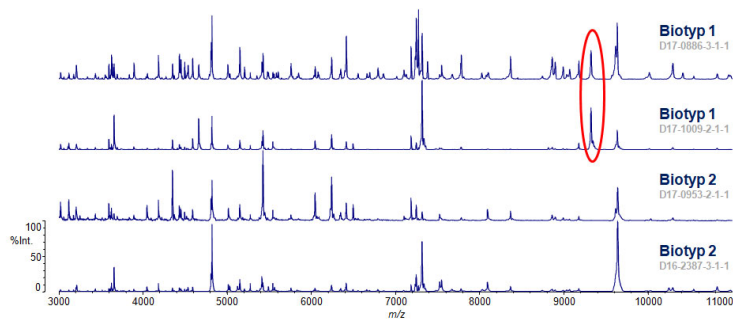


Abbildung 3: MALDI-TOF MS Massenspektren von 4 unterschiedlichen *Yersinia ruckeri* Isolaten mit der Zuordnung der Biotypen.

#### Literatur:

Reference for valid species: LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature; <http://www.bacterio.net/>

Reference for 16S rRNA analysis: EzBioCloud's current microbial taxonomy and genomic diversity, [www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net); 16S rRNA sequences of type strains

Romalde JL, Magariños B, Barja JL, Toranzo AE (1993); Antigenic and Molecular Characterization of *Yersinia ruckeri* Proposal for a New Intraspecies Classification; Systematic and Applied Microbiology; 16, 411-419



## Effekt von *Tylodelphys clavata* auf Sehvermögen und Beuteauswahl bei experimentell infizierten Flussbarschen

Jenny C. Vivas Muñoz, David Bierbach, Sabine Hilt, Klaus Knopf  
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Müggelseedamm 301, 12587 Berlin

### Zusammenfassung

Augenparasiten können das Sehvermögen ihrer Wirte negativ beeinflussen. Wir untersuchten mit parasitenfrei aufgezogenen Flussbarschen, ob sich eine experimentelle Infektion mit *Tylodelphys clavata* auf das Sehvermögen und die Beuteauswahl der Fische auswirkt. Den Flussbarschen wurden bei zwei Lichtintensitäten (6 lux und 600 lux) Wasserasseln und Daphnien gleichzeitig angeboten, die Reaktionsdistanz gegenüber den Beutetieren gemessen und der relative Anteil der konsumierten Beuteart bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Reaktionsdistanz der Flussbarsche von der Infektion mit *T. clavata* und von der Beuteart, aber nicht von den von uns untersuchten Lichtintensitäten abhängt. Bei der höheren Lichtintensität hatte *T. clavata* einen negativen Effekt auf den Wettbewerb der Flussbarsche um Wasserasseln. Die Zusammensetzung des Beutespektrums der Versuchsfische wurde in unserem Versuch jedoch nicht durch die Infektion mit *T. clavata* beeinflusst.

### Summary

Eye parasites can negatively affect the eyesight of their hosts. We investigated with parasite-free raised perch, whether an experimental infection with *Tylodelphys clavata* affects the eyesight and prey selection of fish. At two light intensities (6 lux and 600 lux), perch were offered water lice and *Daphnia* simultaneously, the reaction distance to the prey items was measured and the relative proportion of the prey species consumed was determined.

It was found that the reaction distance of perch depends on the infection with *T. clavata* and on the prey species, but not on the light intensities we studied. At the higher light intensity *T. clavata* had a negative effect on the competition of perch for water lice. However, in our experiment, the composition of the prey spectrum of the fish was not influenced by infection with *T. clavata*.

## Einleitung

In einer früheren Studie (Vivas Muñiz et al. 2017) konnten wir zeigen, dass bei natürlich infizierten Flussbarschen die Reaktionsdistanz gegenüber Wasseraseln als Beutetiere negativ mit der Anzahl der Metazerkarien von *Tylodelphys clavata* in den Augen korreliert, und dass geringer infizierte Fische im Wettbewerb um eine limitierte Ressource den stärker infizierten Fischen überlegen sind. Bei diesem Experiment blieb es aber offen, ob beobachtete Verhaltensänderungen Ursache oder Folge einer Infektion sind.

Die Reaktionsdistanz eines Fisches gegenüber einem Beutetier wird als Maß für dessen Sehfähigkeit verwendet (Vinyard and O'Brien 1976). Die Effekte von Augenparasiten können weitreichende Auswirkungen auf die Ökologie eines visuellen Jägers wie dem Flussbarsch haben (Bergman 1988; Diehl 1988). Beispielsweise müssen infizierte Fische möglicherweise mehr Zeit aufwenden, um einen ähnlichen Erfolg bei der Nahrungssuche zu erzielen wie nicht oder geringer infizierte Artgenossen. Diese Änderung des Zeitbudgets kann das Prädationsrisiko erhöhen (Crowden und Broom 1980). Des Weiteren können infizierte Fische ihre Nahrungspräferenzen ändern, um die verringerte Wettbewerbsfähigkeit zu kompensieren (Milinski 1984; Barber and Huntingford 1995).

Zur Überprüfung, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der Infektion mit *T. clavata* und der Reaktionsdistanz gegenüber einem Beutetier besteht, verwendeten wir in dem hier beschriebenen Versuch im Labor aufgezogene und experimentell infizierte Fische. Ein möglicher Einfluss der Infektion mit *T. clavata* auf die Präferenz für einen Beutetyp wurde untersucht, indem den Fischen gleichzeitig *Asellus aquaticus* und *Daphnia magna* angeboten wurden. Da auch die Umweltbedingungen die visuelle Leistung von Fischen und deren Interaktion mit ihrer Beute beeinflussen können (Sandström 1999), stellten wir die Hypothese auf, dass sich der negative Einfluss von *T. clavata* auf die Sehfähigkeit der Fische bei verringerter Lichtintensität verstärkt. Um dies zu überprüfen, wurden die Beobachtungen bei zwei Lichtintensitäten durchgeführt.

## Material und Methoden

Flussbarsche wurden ab dem Eistadium parasitenfrei im Labor aufgezogen und im Alter von acht Monaten durch Exposition gegenüber jeweils 300 Zerkarien mit *T. clavata* infiziert. Die Zerkarien stammten aus natürlich infizierten Schnecken der Gattung *Radix* und wurden nach Faltýnková et al. (2007) and Mikeš (2001) bestimmt. Am Ende des Experiments wurden die Fische getötet und die Augen untersucht. Es zeigte sich, dass die Versuchsfische mit  $167 \pm 31$  Metazerkarien infiziert waren. Neun Monate nach der

Infektion wurden die infizierten Fische und nicht infizierte Kontrollfische markiert (Visible Implant Elastomer, VIE, Northwest Marine Technology, Shaw Island, WA, USA). Die Verhaltensbeobachtungen erfolgten dann zehn Monate nach der Infektion in Glasaquarien (100 x 40 x 50 cm, Wasserstand 45 cm). Zu diesem Zeitpunkt hatten die Fische eine Länge von 13 bis 16 cm. Eine LED-Beleuchtung (5500 K) wurde auf eine Beleuchtungsstärke von 600 lx (hohe Lichtintensität) und 6 lx (geringe Lichtintensität) eingestellt; die Beleuchtungsdauer war 12 h mit einer Auf- und Abdimmphase von 0,5 h.

Die Flussbarsche wurden in Gruppen von jeweils zwei infizierten und zwei nicht infizierten Tieren beobachtet. Die Fische wurden so ausgewählt, dass sie innerhalb einer Gruppe dieselbe Größe hatten (Größendifferenz innerhalb einer Gruppe max. 2 mm). Nach einer Eingewöhnungszeitzeit von einer Woche wurden die Fische 24 h lang nicht gefüttert. Dann wurden ihnen 30 *A. aquaticus* (Länge 5 – 8 mm) und 40 *D. magna* angeboten. Damit sich die Wasserasseln nicht nur entlang der schwarzen Silikonnähte des Aquariums aufhielten und für die Fische nicht zu einfach erkennbar waren, wurden schwarze Steinchen (2 – 4 mm) gleichmäßig auf der Bodenfläche des Aquariums verteilt.

Das Beutesuchverhalten der Flussbarsche wurde über 45 min mit zwei Kameras aufgezeichnet (Sony  $\alpha$  7S, Sony, Tokyo, Japan; Objektiv: ZEISS Batis 2/25, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), die vor und über dem Aquarium positioniert waren. Jede Kamera war mit einem Rekorder mit Monitor (Shogun inferno, Atomos Global Pty Ltd, Port Melbourne, Australia) verbunden, was die Kamerakontrolle und Beobachtung von außerhalb des Versuchsaufbaus ermöglichte.

Anhand der aufgenommenen Filme wurde die Reaktionsdistanz der Fische bestimmt. Als Reaktionsdistanz wurde die Strecke zwischen Schnauze des Fisches und dem Beutetier zu dem Zeitpunkt definiert, wenn sich der Fisch gegenüber dem Beutetier ausrichtet und beschleunigt. Die mittlere Reaktionsdistanz eines Fisches gegenüber *A. aquaticus* und *D. magna* wurde aus den jeweils ersten 20 Attacken eines Fisches berechnet. Die Erfolgsrate berechnete sich als Quotient der Attacken, bei denen ein Beutetier aufgenommen wurde und den insgesamt beobachteten Attacken. Zusammenhänge zwischen Infektionsstatus, Lichtintensität und Reaktionsdistanz bzw. Erfolgsrate wurde mit einem linearen gemischten Modell (LMM) analysiert. Die mögliche Präferenz gegenüber einer der beiden Beutetierarten in Abhängigkeit von der Infektion mit *T. clavata* und der Lichtintensität wurde anhand des Anteils an *A. aquaticus* an den insgesamt konsumierten Beutetieren mit einem Kruskal-Wallis Test analysiert.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Metazerkarien von *T. clavata* leben im Glaskörper des Auges. Es ist gut vorstellbar, dass sie das Sehvermögen ihres Wirtes beeinträchtigen, wenn sie sich im Strahlengag des Auges bewegen (Stumbo und Poulin 2016).

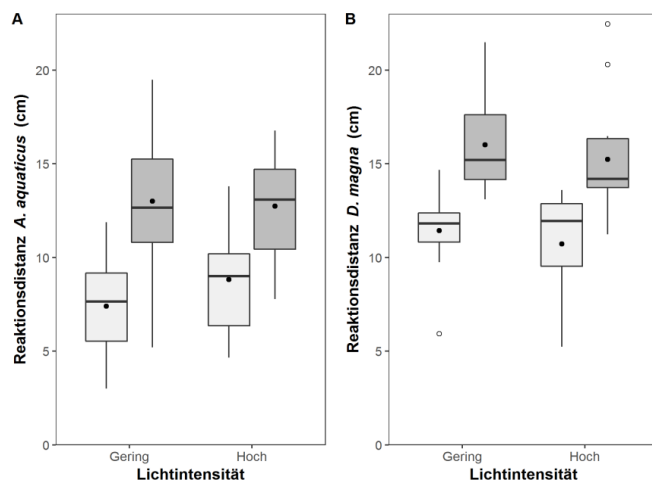
Weiterhin ist bekannt, dass sich die Metazerkarien besonders im Bereich der Ligamente befinden, die für die Fokussierung wichtig sind (Kennedy 2001; Khorramshahi et al. 2008). Auch hier ist eine funktionelle Beeinträchtigung des Auges denkbar. Für einen visuellen Räuber wie dem Flussbarsch kann eine eingeschränkte Sehfähigkeit weitreichende Konsequenzen haben.

Unabhängig von der Lichtintensität war die Reaktionsdistanz infizierter Flussbarsche gegenüber beiden Beutetieren geringer als die der nicht infizierten Kontrollfische (in beiden Fällen  $p < 0,001$ ; Abb. 1). Ebenfalls unabhängig von der Lichtintensität war die Erfolgsrate der Attacken gegenüber

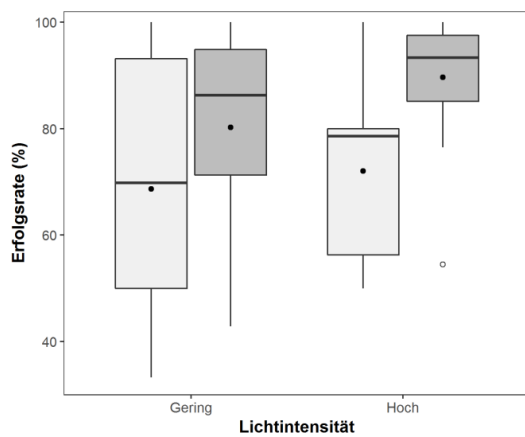
*A. aquaticus* bei den infizierten Fischen reduziert ( $p = 0,021$ ; Abb. 2). Somit konnten wir experimentell einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *T. clavata* und der Reaktionsdistanz sowie dem Erfolg der Nahrungssuche nachweisen und die Ergebnisse des vorangegangenen Versuches mit natürlich infizierten Flussbarschen (Vivas Muñiz et al. 2017) bestätigen.

Die Hypothese, dass eine Verringerung der Lichtintensität den negativen Einfluss von *T. clavata* auf die Reaktionsdistanz der Fische verstärkt, wurde mit unserem Experiment nicht bestätigt. Normalerweise reduziert sich die Reaktionsdistanz visuell jagender Raubtiere, wenn die Lichtintensität einen bestimmten Schwellenwert unterschreitet (Vinyard und O'Brien 1976). Für den Flussbarsch wurde gezeigt, dass sich der Jagderfolg bei 0,02 lx auf 60% reduziert (Bergman 1988), und die Reaktionsdistanz des nahe verwandten amerikanischen *Perca flavescens* nimmt stark ab, wenn die Lichtintensität unter 2 lx fällt (Richmond et al. 2004). Daher ist anzunehmen, dass unsere geringste Beleuchtungsstärke von 6 lx, die durch die Leistungsfähigkeit der Kamera vorgegeben wurde, nicht niedrig genug war, um einen signifikanten zusätzlichen Effekt auf die Reaktionsdistanz oder die Erfolgsrate der Flussbarsche zu bewirken.

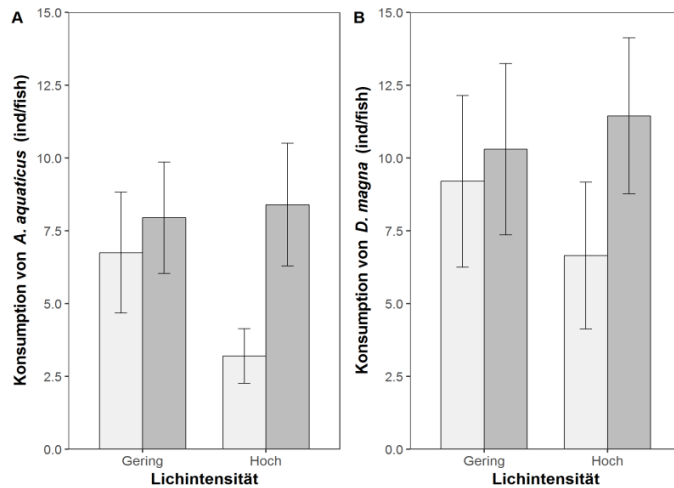
Generell bestand die Tendenz, dass infizierte Fische weniger der verfügbaren Beute konsumierten als nicht infizierte Fische (Abb. 3). Die Anzahl der von den nicht infizierten Fischen gefressenen *A. aquaticus* war unabhängig von der Lichtintensität. Die infizierten Fische konsumierten bei der hohen Lichtintensität hingegen signifikant weniger *A. aquaticus* als ihre nicht infizierten Artgenossen ( $p = 0,002$ ). Dieser Unterschied bei der geringen Lichtintensität jedoch nicht zu beobachten.



**Abb. 1:** Reaktionsdistanz mit *T. clavata* infizierter (hellgrau) und nicht infizierter (dunkelgrau) juvenile Flussbarsche gegenüber (A) *A. aquaticus* und (B) *D. magna* bei hoher (600 Lux) und geringer (6 Lux) Lichtintensität.



**Abb 2:** Anteil erfolgreicher Attacken mit *T. clavata* infizierter (hellgrau) und nicht infizierter (dunkelgrau) juveniler Flussbarsche auf *A. aquaticus* bei hoher (600 Lux) und geringer (6 Lux) Lichtintensität.



**Abb 3:** Konsum von (A) *A. aquaticus* und (B) *D. magna* durch mit *T. clavata* infizierte (hellgrau) und nicht infizierte (dunkelgrau) juvenile Flussbarsche bei hoher (600 Lux) und geringer (6 Lux) Lichtintensität (Mittelwert  $\pm$  SD).

Die offensichtliche Kompensation der durch die Infektion mit *T. clavata* verringerte Wettbewerbsfähigkeit kann damit erklärt werden, dass sich die Aktivität von *A. aquaticus* bei geringer Lichtintensität erhöht und die Beute so leichter von den Fischen wahrgenommen werden kann.

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Konsumption von *D. magna*, doch hier ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit der Lichtintensität oder dem Infektionsstatus. Dies könnte damit zusammenhängen, dass infizierte Fische ihre eingeschränkte Sehfähigkeit zumindest teilweise durch Informationen von nicht infizierten Artgenossen ausgleichen können. Einer der Vorteile, in einer Gruppe zu leben, ist es, dass Nahrungsquellen besser aufgespürt werden können (Pitcher and Parrish 1993), und für den Flussbarsch wurde gezeigt, dass er in der Gruppe einen höheren Fangerfolg hat (Eklöv 1992). Diese Strategie dürfte vor allem dann rentabel sein, wenn die Beutetiere in Gruppen auftreten, so wie dies bei *D. magna* in unserem Experiment der Fall war.

Die meisten Fische zeigten bei unserem Versuch eine Präferenz für eine der beiden Beutetierarten. Bei geringer Lichtintensität konsumierte ein Drittel

der Fische überwiegend *A. aquaticus* und ein weiteres Drittel überwiegend

*D. magna* (jeweils > 80% aller konsumierten Tiere). Ein ähnliches Muster wurde bei hoher Lichtintensität beobachtet, wobei 70% der Fische die gleiche Beutepräferenz wie bei der geringen Lichtintensität zeigten. Die Beutepräferenz der Fische stand jedoch in keinem Zusammenhang mit der Infektion mit *T. clavata*. Dennoch ist es gut möglich, dass *T. clavata* die Rolle seines Wirtes im Nahrungsnetz beeinflusst. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass infizierte Fische wegen ihres geringeren Fangerfolgs mehr Zeit für die Nahrungssuche aufwenden müssen, wodurch sich ihr Prädationsrisiko erhöht. Es ist eine interessante Frage für weitere Studien, ob infizierte Fische als Ausgleich eine verringerte Konkurrenzfähigkeit ihre Risikobereitschaft bei der Nahrungssuche verändern.

#### Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Graduiertenschule IMPAct-Vector durchgeführt, die vom Senatsausschuss Wettbewerb (SAW-2014-SGN-3) der Leibniz-Gesellschaft gefördert wurde.

Verändert und übersetzt mit Erlaubnis von Springer Nature, Parasitology Research. Dort ist eine umfangreichere Version dieser Arbeit in englischer Sprache publiziert: Vivas Muñoz JC, Bierbach D, Knopf K. Eye fluke (*Ty. lodelphys clavata*) infection impairs visual ability and hampers foraging success in European perch. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06389-5>

#### Literatur

- Barber I., Huntingford F.A. (1995). The effect of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea) on the foraging and shoaling behaviour of three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. Behaviour, 132:1223–1240
- Bergman E (1988). Foraging abilities and niche breadths of two percids, *Perca fluviatilis* and *Gymnocephalus cernua*, under different environmental conditions. Journal of Animal Ecology 57: 443-453
- Crowden AE, Broom DM (1980). Effects of the eyefluke, *Diplostomum spathaceum*, on the behaviour of dace (*Leuciscus leuciscus*). Animal Behaviour 28:287–294
- Diehl S (1988). Foraging efficiency of three freshwater fishes: effects of structural complexity and light. Oikos 53:207–214

- Eklöv P (1992). Group foraging versus solitary foraging efficiency in piscivorous predators: the perch, *Perca fluviatilis*, and pike, *Esox lucius*, patterns. *Animal Behaviour* 44:313–326
- Faltýnková A, Našincová V, Kablášková L (2007). Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. *Parasite* 14:39–51
- Kennedy CR (2001). Interspecific interactions between larval digeneans in the eyes of perch, *Perca fluviatilis*. *Parasitology* 122: S13–S22
- Khorramshahi O, Schartau JM, Kröger RHH (2008). A complex system of ligaments and a muscle keep the crystalline lens in place in the eyes of bony fishes (teleosts). *Vision Research* 48: 1503–1508
- Mikeš L (2001). Simplified Determination Key, Cercariae. 1st Workshop on bird schistosomes and cercarial dermatitis. Dolní Věstonice, Czech Republic
- Milinski M (1984). Parasites determine a predator's optimal feeding strategy. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 15:35–37
- Pitcher TJ, Parrish JK (1993). Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: Pitcher TJ (ed) *Behaviour of teleost fish*. Chapman & Hall, London, pp 363–439
- Richmond HE, Hrabik TR, Mensinger AF (2004). Light intensity, prey detection and foraging mechanisms of age 0 year yellow perch. *Journal of Fish Biology* 65:195–205
- Sandström, A (1999). Visual ecology of fish – a review with special reference to percids. *Fiskeriverket Rapport* 2: 45–80
- Stumbo AD, Poulin R (2016). Possible mechanism of host manipulation resulting from a diel behaviour pattern of eye-dwelling parasites? *Parasitology* 143: 1261–1267
- Vinyard GL, O'Brien J (1976). Effects of light and turbidity on the reactive distance of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33: 2845–2849
- Vivas Muñoz, JC, Staaks, G, Knopf, K (2017): The eye fluke *Tylodelphys clavata* affects prey detection and intraspecific competition of European perch (*Perca fluviatilis*). *Parasitology Research* 116: 2561–2567



## Schlechte Lagerung – Schlechte Fischfutter?

Constanze Pietsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zürcher Fachhochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Forschungsgruppe Fish Welfare, Campus Grüental, CH-8820 Wädenswil

### Zusammenfassung

Eine optimale Lagerung von Fischfutter ist nicht einfach für viele Fischzuchtbetriebe. Was qualitativ mit einem kommerziellen Fischfutter passieren kann, das über 30 Tage bestimmten Lagerungsbedingungen ausgesetzt wurde, zeigt diese Studie.

### Summary

Optimal storage of fish feeds is a challenge for many fish farmers. What may happen to a commercial fish feed under different storage conditions, is shown in this study.

Ausgewählt wurde ein kommerzielles Forellenfutter mit einem Rohprotein-gehalt von 40.6% und einem Rohfettgehalt von 29.3 % bestehend vor allem aus Fischmehl, Weizenbestandteilen und Fischöl. Für den Versuch wurden jeweils gleiche Mengen des Futters (3.5 kg) eingewogen und in 10 L Behälter gefüllt. Für 30 Tage wurden nun tiefe Temperaturen (6-10 °C) mit hohen und niedrigen Feuchtigkeiten in den Behältern eingestellt und ebenfalls hohe Temperaturen (25-35 °C) mit den hohen und niedrigen Feuchtigkeiten kombiniert mit jeweils 3 Replikaten für jeden Ansatz. Dabei wurde eine erhöhte Feuchtigkeit (70-80 % relative Luftfeuchtigkeit) durch Wasserzugabe zu den Behältern erreicht und eine niedrigere Feuchtigkeit (20-30 % relative Luftfeuchtigkeit) durch Hinzufügen von Silicagel in einer Aluminiumschale in den Behältern ermöglicht. Die Behälter wurden über den Versuchszeitraum versiegelt. Die unterschiedlichen Temperaturregimes wurden durch die Umgebungstemperaturen in verschiedenen Räumen möglich. Die Feuchtigkeits- und Temperaturwerte wurden über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich über Logger in den Behältern aufgezeichnet.



Nach 30 Tagen wurden die Feuchtegehalte der Futtermittel in den Behältern untersucht. Diese zeigten einen Feuchtigkeitsgehalt von 7-9 % in den trocken gelagerten Futtermitteln, während die feucht gelagerten Futtermittel Feuchtegehalte zwischen 18 und 20 % aufzeigten. Weiterhin wurden die Mycotoxingehalte und die Nährwerte der Futtermittel analysiert. Bei den Mykotoxinen wurden folgende Substanzen durch ein externes Labor untersucht: Aflatoxin B1, B2, G1 und G2, T2 und HT2 Toxin, Zearalenone (ZEN), Deoxynivalenol (DON), Fumonisine (FB1 und FB2) und Ochratoxin A (OTA). Während die Nährwerte der verschiedenen behandelten Futtermittel nur geringe Veränderungen über die Versuchsperiode zeigten, zeigten sich deutliche Unterschiede in den OTA Konzentrationen in den behandelten Futtermitteln. Insbesondere in der warmen und feuchten Lagerung zeigten sich hohe OTA Konzentrationen (im Mittel 171 µg/kg). Für diese kann angenommen werden, dass sie für Fische in der Aquakultur ein gesundheitliches Risiko darstellen. Für die übrigen untersuchten Mycotoxine zeigt sich kein Risiko für Fische. Das Ausmass des Pilzwachstums auf Fischfuttermitteln wird aber essentiell durch deren Rohstoffzusammensetzung beeinflusst und ein mehr pflanzliches Futtermittel hätte vermutlich eine höhere Toxinbildung zur Folge. Schlussendlich zeigt diese Studie, dass vor allem die Feuchtigkeit und die Temperatur während der Lagerung die Mycotoxinbildung im Futter selbst über einen recht kurzen Zeitraum von 30 Tagen deutlich erhöhen können. Es wird weiterhin erwartet, dass eine längere Lagerung auch zu stärkerer Toxinbildung führen würde.

Eine umfangreichere Version dieser Arbeit in englischer Sprache ist hier publiziert: Pietsch, C.; Müller, G.; Mourabit, S.; Carnal, S.; Bandara, K. Occurrence of Fungi and Fungal Toxins in Fish Feed during Storage. *Toxins* 2020, 12, 171. <https://doi.org/10.3390/toxins12030171>

## Krankheit durch Abwasser? Untersuchung des Abwassereinflusses auf eine Parasiteninfektion bei Wildfischen

Christyn Bailey<sup>1</sup>, Aurélie Rubin<sup>1,2</sup>, Nicole Strepparava<sup>1</sup>, Helmut Segner<sup>1</sup>,  
Jean-François Rubin<sup>2,3</sup>, Thomas Wahli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Departement für Infektionskrankheiten und Pathobiologie, Universität Bern, Länggassstrasse 122, 3001 Bern, Schweiz

<sup>2</sup>) Maison de la Rivière, Chemin du Boiron 2, 1131 Tolochenaz, Schweiz

<sup>3</sup>) HEPIA, Rue de la Prairie 4, 1202 Genf, Schweiz

### Zusammenfassung

Oekosysteme werden durch verschiedenste Faktoren beeinflusst. In aquatischen Systemen sind Abwässer aus Kläranlagen ein potentieller Risikofaktor für die Fauna. Solche Abwässer können einerseits zur Eutrophierung beitragen, andererseits können nicht abgebaute Stoffe anthropogenen Ursprungs aquatische Lebewesen direkt oder indirekt beeinträchtigen. Beides, Eutrophierung und Exposition an die Umwelt belastende Substanzen können einen Einfluss auf die Dynamik von Wirt-Parasit-Beziehungen ausüben. Diese Möglichkeit sollte am Beispiel der Proliferativen Nierenkrankheit von Forellen, verursacht durch den Parasiten *Tetracapsuloides bryosalmoae*, untersucht werden. PKD wird in der Schweiz als Mitursache für eine seit Jahren bestehende Verminderung der Bachforellenpopulationen betrachtet.

Im vorliegenden Projekt wurde das PKD-Geschehen in Bachforellen-Sömmerlingen an zwei Stellen desselben Gewässers über mehrere Monate hinweg untersucht. Die beiden Stellen lagen 400 Meter auseinander. Struktur und Temperaturbedingungen unterschieden sich nicht. Aber unterhalb der oberen Stelle entwässerte eine Kläranlage in den Bach. Zwar wurden alle gesetzlichen Einleitungsvorgaben eingehalten, trotzdem konnte mit einer standardisierten Messmethode ein kleiner Unterschied in der Gewässergüte gemessen werden. Untersucht wurde die Hypothese, dass die Empfindlichkeit der Forellen für PKD in Bezug auf Prävalenz und Krankheitsgeschehen an der Abwasser-beeinflussten Stelle grösser ist. Folgende Parameter wurden gemessen: Prävalenz, Infektionsintensität, Gesundheitszustand (Ausprägung pathologischer Veränderungen) und geschätzte Überlebensrate.

Zu verschiedenen Zeitpunkten konnten Unterschiede bei allen gemessenen Parametern zwischen den beiden Stellen nachgewiesen werden, was auf einen klaren Effekt des Abwassers hinwies. Allerdings war es basierend auf diesen

Untersuchungen nicht möglich, zu ermitteln, ob das Abwasser einen direkten Einfluss auf den Fisch bzw. dessen Fähigkeit mit dem Parasiten umzugehen, hatte, oder ob der Einfluss indirekt war, z.B. durch eine höhere Dichte von Bryozoen und damit mehr Parasiten im Gewässer.

Mit diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass bereits eine geringgradig verringerte Gewässergüte Konsequenzen für die darin lebenden Tierpopulationen haben kann.

### Summary

Ecosystems are exposed to and influenced by a vast variety of factors. An important factor in aquatic ecosystems is represented by effluents of waste water treatment plants (WWTP). On one hand, effluents can contribute to eutrophication of water bodies, on the other hand, they can contain contaminants which may influence aquatic life directly or indirectly. Both, eutrophication and exposure to contaminants can affect the dynamics of host-pathogen relationships. Considering this we explored the effect of WWTP effluents on a host parasite model represented by the brown trout as fish host and the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae* as the parasite. Infection of fish results in the Proliferative Kidney Disease (PKD), a condition suspected to contribute to the decrease in brown trout catches seen since many years in Switzerland.

Young of the year brown trout were investigated at two sites of the same river over a period of several months. The two sites with similar ecology with regards to structure and water temperature were located 400 m apart. Between the sites there was the discharge of a WWTP resulting in a slight degradation of the water quality as measured by a standardized system using the composition of macrozoobenthos. The hypothesis that fish exposed to the treated waste water show greater susceptibility to *T. bryosalmonae* infection in terms of prevalence and disease outcome was tested. Susceptibility was assessed by infection prevalence, infection intensity, degree of kidney alterations and estimated survival of fish.

At different time points significant differences in measured parameters between the two sites could be demonstrated, indicative for an effect of the treated water on the host parasite system. However, the results did not allow to determine whether the differences were due to an altered capability of the fish host to handle the infection or due to increased growth of bryozoans, the invertebrate host of the parasite, resulting in increased amounts of parasite spores in the water and thus a higher infection pressure.

With this project it could be shown that even a slight degradation of the water quality may affect the health status of aquatic animals inhabiting the respective water body.

## Einleitung

Zahlreiche Faktoren können die Habitate aquatischer Lebewesen beeinflussen. Dieser Einfluss kann direkt sein, indem beispielsweise die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Laichgeschäft durch Verdichtung der Gewässersohle verhindert wird oder indirekt, in dem höhere Wassertemperaturen zu einer stärkeren Vermehrung von Pathogenen und damit zu einem höheren Druck auf empfängliche Arten führen. In der Schweiz wird seit Jahren ein massiver Rückgang der Fänge von einheimischen Bachforellen festgestellt. Als mögliche Ursachen wird ein direkter Einfluss erhöhter Wassertemperaturen auf den Fisch diskutiert aber auch ein Einfluss von Infektionskrankheiten wird in Betracht gezogen. Im Vordergrund steht dabei die Proliferative Nierenkrankheit (PKD), verursacht durch den zum Stamm der Myxozoa gehörenden Parasiten *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Während ein Einfluss der Wassertemperatur auf die PKD mehrfach nachgewiesen wurde, sind andere Faktoren weniger gut untersucht worden. Dazu gehört unter anderem der Einfluss von Abwasser. Dieses kann durch Eutrophierung und eingetragene Schadstoffe direkt auf Fische wirken oder einen indirekten Einfluss durch eine Veränderung der Wirt-Pathogen Beziehung haben. Im hier beschriebenen Projekt gingen wir der Frage nach, ob geklärtes Abwasser einen Einfluss auf die PKD bei unter Feldbedingungen exponierten Bachforellen ausüben kann. Die Hypothese war dabei, dass Fische, die Abwasser ausgesetzt sind, eine höhere Empfänglichkeit für den Parasiten ausgedrückt durch eine höhere Prävalenz und damit einhergehend schwerwiegendere Krankheitsanzeichen aufweisen, als im gleichen System gehaltene aber nicht dem Abwasser ausgesetzte Tiere.

## Material und Methoden

Als Testgebiet wurde ein Bach im Kanton Waadt, der Boiron de Morges, mit bekanntem *T. bryosalmonae* Vorkommen ausgewählt. Die Teststrecke umfasste eine Länge von 400 m. Die Gewässermorphologie war innerhalb dieser Strecke einheitlich. Der einzige Unterschied bestand darin, dass in der Mitte der Strecke eine Abwasser-Reinigungsanlage (ARA) in den Bach entwässerte. Es gab keine weiteren Zuflüsse. Die Wasserqualität wurde mit dem in der Schweiz gebräuchlichen Macrozoobenthos-Index (IBCH-Index) am oberen und unteren Ende der Versuchsstrecke bestimmt. Die Werte lagen mit 14 oberhalb und 12 unterhalb des Einlaufes nur geringfügig auseinander, wobei die Skala von 0 (= sehr schlecht) bis 20 (= sehr gut) reicht (Stucki 2010). Die Wassertemperatur wurde mit Loggern ober- und unterhalb der Teststrecke regelmässig gemessen. Im Juli erfolgte eine Elektroabfischung im gesamten Gewässer, bei dem alle gefangenen Bachforellen-Sömmerlinge mit PIT-Tags markiert wurden. Von Juni bis Oktober wurden monatlich je 25 Sömmerlinge am oberen und unteren Ende der 400 Meter Strecke für die Untersuchung auf

PKD entnommen. Die Tiere wurden euthansiert und gewogen. Die Infektionsintensität wurde sowohl mit qPCR als auch mit Histologie von Nierenmaterial ermittelt. Der Grad der Nierenveränderung (Proliferation und Fibrosierung) wurde anhand von Nierenschnittpäparaten mit einem Bewertungsschema von 0-6 bestimmt. Ebenfalls ermittelt wurde die Überlebensrate der Fische mittels Elektroabfischung des Gesamtgewässers, Identifikation der Fische anhand der PIT-Tags und der Suche nach unbewegten PIT-Tags im Gewässer. Bei Letzteren wurde davon ausgegangen, dass sie von gestorbenen Tieren stammten. Mit den Befunden der qPCR der Einzelfische konnte die Prävalenz der beprobten Fischgruppen errechnet werden.

Die Resultate der Stellen oberhalb und unterhalb des Kläranlageneinlaufes wurden verglichen und Unterschiede statistisch bewertet.

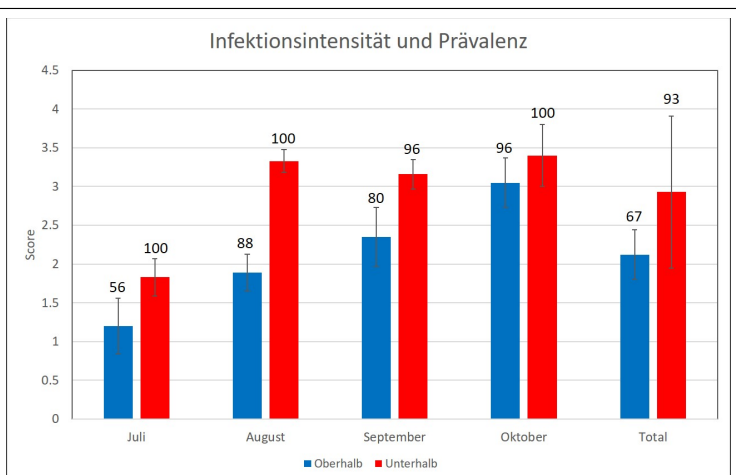
### **Resultate**

Der Temperaturverlauf ober- und unterhalb des ARA-Einlaufes war einheitlich und es zeigten sich kaum Unterschiede in den mittleren Tagestemperaturwerten der beiden Stellen ( $< 1^{\circ}\text{C}$ ).

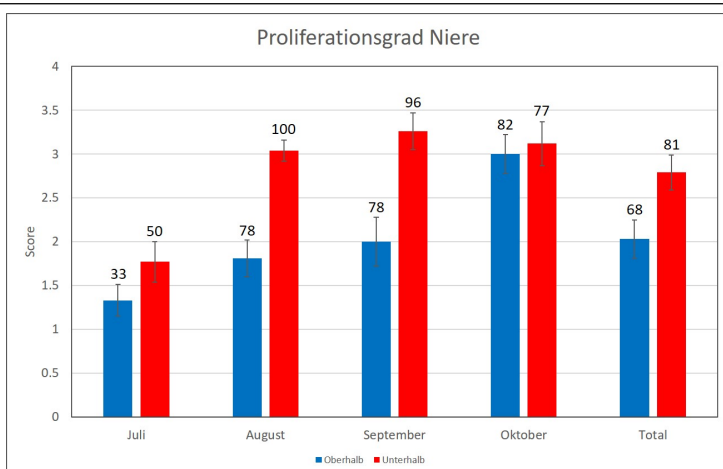
Bei den einzelnen gemessenen Parametern der Fische zeigten sich Unterschiede. Die Fische der Stelle oberhalb des ARA-Einflusses waren schwerer als die Tiere unterhalb des Einlaufes, wobei die Unterschiede im Juni, August und September signifikant ausfielen.

Die Infektionsintensität war bei allen Beprobungsdaten unterhalb des ARA-Einlaufes höher als oberhalb (Fig. 1). Der Unterschied war aber nur bei der August-Probenahme sowie bei der Berücksichtigung aller Probenahmen signifikant. Dasselbe Bild zeigte sich bezüglich der Prävalenz. Auch hier waren die Werte der unterhalb des ARA-Einlaufes gefangenen Gruppen immer höher (Fig. 1). Signifikant war der Unterschied aber auch nur, wenn alle Probenahmen berücksichtigt wurden.

Der Proliferationsgrad der Nieren von Forellen, die unterhalb des ARA-Auslaufes gefangen worden waren, erwies sich immer als höher als derjenige von Tieren von oberhalb des Auslaufes. Bei den ersten drei Probenahmen waren auch mehr Tiere mit Veränderungen unterhalb als oberhalb gefangen worden. Einzig bei der Probenahme im Oktober war das Verhältnis umgekehrt.



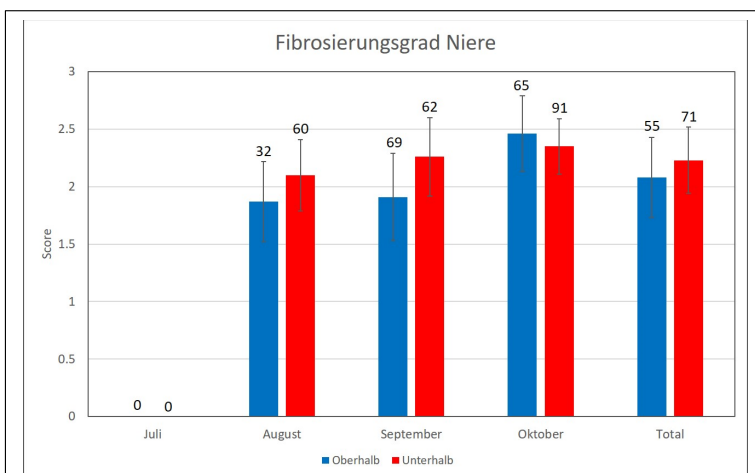
Figur 1. Vergleich der *T. bryosalmonae* -Intensität in der Niere von Bachforellen, die oberhalb und unterhalb eines ARA-Einlaufes entnommen worden waren (Score 0-6). Zahlen über Balken repräsentieren die Prävalenz.



Figur 2. Vergleich des Proliferationsgrades von mit *T. bryosalmonae* infizierten Nieren von Bachforellen, die oberhalb und unterhalb eines ARA-Einlaufes gefangen worden waren. Zahlen über Balken repräsentieren den Anteil von Tieren mit Veränderungen.



Beim Fibrosierungsgrad zeigte sich ein ähnliches Bild, wie bei der Proliferation, wobei erste Fibrosierungen erst ab August zu erkennen waren (Fig. 3). Im August und September war der Grad bei Fischen von oberhalb des ARA-Einlaufes geringer, bei der letzten Probenahme im Oktober fanden sich dagegen stärkere Fibrosierungen in den Nieren von Fischen der Stelle oberhalb des Einlaufes. Ausser im September waren aber immer mehr Fische von unterhalb des Einlaufes von Fibrosierungen betroffen.



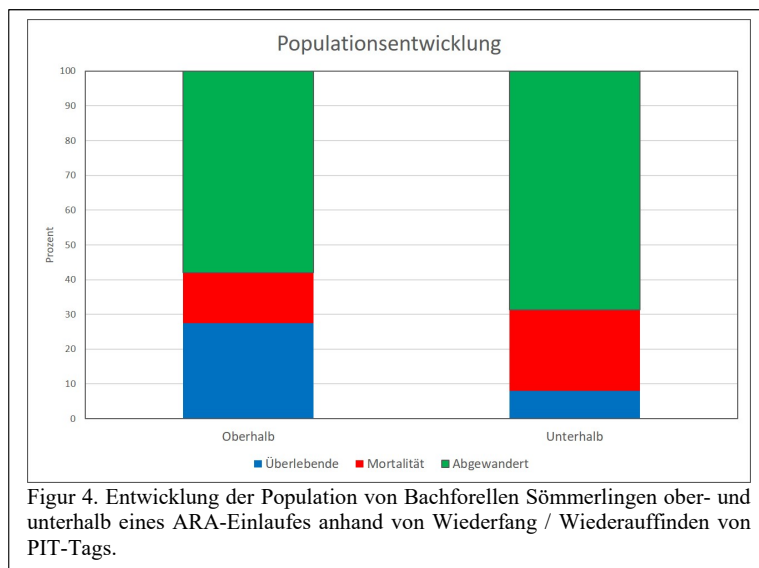
Figur 3. Vergleich der Fibrosierungsintensität in Nieren von mit *T. bryosalmonae* infizierten Bachforellen von oberhalb und unterhalb eines ARA-Einlaufes. Zahlen über Balken repräsentieren den Anteil von Tieren mit Fibrosierung.

Unterschiede zeigten sich auch in der Überlebensrate. Diese wurde basierend auf dem Wiederfang von markierten Fischen ermittelt. Der prozentuale Anteil wiedergefangener Forellen war an der Stelle oberhalb des ARA-Einlaufes grösser als unterhalb. Demgegenüber wurden im Bachbett unterhalb des ARA-Auslaufes ein höherer Anteil von PIT-Tags bezogen auf die ursprünglich an dieser Stelle markierter Fische gefunden als oberhalb, was auf eine höhere Mortalität hinweist. Schliesslich war auch der Anteil abgewanderter Fische an der unteren Probestelle grösser als an der oberen (Fig. 4).

### Diskussion und Folgerungen

Die Resultate der durchgeführten Studie weisen auf einen Einfluss von geklärtem Abwasser auf die PKD bei Bachforellen hin. Das durchschnittliche

Fischgewicht der Fische von oberhalb des ARA-Zuflusses war zu jedem Zeitpunkt grösser als unterhalb. Da der Nierenproliferationsgrad an dieser Stelle aber regelmässig geringer war, kann ausgeschlossen werden, dass der Gewichtsunterschied durch den Proliferationsgrad der Niere und einer damit zusammenhängenden Gewichtszunahme verursacht wurde.



Figur 4. Entwicklung der Population von Bachforellen Sömmerningen ober- und unterhalb eines ARA-Einlaufes anhand von Wiederfang / Wiederauffinden von PIT-Tags.

Auch die Mehrzahl der weiteren gemessenen Parameter (Infektionsintensität, Proliferationsgrad, Prävalenz, Mortalität) war in Bachforellensömmerningen von oberhalb des ARA-Einlaufes geringer als unterhalb. Einzig der Fibrosierungsgrad war nicht zu jedem Zeitpunkt geringer bei Fischen von oberhalb des Einlaufes. Fibrosierung tritt bei der Regeneration eines Organes auf. Ein höherer Grad könnte somit bedeuten, dass die Regeneration stärker voranschreitet, was wiederum darauf hinweist, dass der Gesamtzustand der Forellen von oberhalb des ARA-Einflusses besser war. Dies wird auch durch die höhere Prävalenz, die höhere Mortalität und die höhere Abwanderungsrate von Fischen an der Klärwasser – exponierten Stelle unterstützt.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings der Mechanismus, der zu einer beeinträchtigten Gesundheit der Abwasser-ausgesetzten Fische führte, nicht ermittelt werden. Möglich wäre ein Einfluss von Wasserinhaltsstoffen, welche die Fische empfänglicher für einen Parasitenbefall machen, was zu den höheren Prävalenzen und Parasitenmengen geführt haben könnte.

Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass Wasserinhaltsstoffe das Wachstum von Bryozoen, dem Wirbellosen-Wirt von *T. bryosalmonae*, gefördert haben, was indirekt zu einer grösseren Parasitenmenge im Gewässer und damit zu einem höheren Infektionsdruck geführt haben könnte. Beide Mechanismen kommen als Ursache für die gefundenen Unterschiede in Frage.

Unter Berücksichtigung der kaum vorhandenen Temperaturunterschiede zwischen den beiden Probestellen, bleibt als mögliche Ursache für die festgestellten Unterschiede die Wasserqualität. Trotzdem kann die eingangs aufgestellte Hypothese nicht abschliessend bestätigt oder verworfen werden. Aber ein Einfluss von geklärtem Abwasser liess sich mit der Studie nachweisen, was die ökologische Relevanz von Abwasserzuleitungen in Gewässer unterstreicht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die durch den Makrozoobenthos-Index gemessene Qualitätsunterschied des Wassers nur gering war und dass sämtliche Messwerte unterhalb der von der Schweizer Gesetzgebung vorgegebenen Grenzwerte lagen.

Mit Laborexperimenten soll in einem nächsten Schritt der Einfluss von geklärtem Abwasser auf die PKD bei Forellen unter kontrollierten Bedingungen getestet werden. Mit der Exposition von Fischen an eine definierte Parasitenmenge kann ausgeschlossen werden, dass die Dichte der Erreger eine Rolle spielt und somit ein Einfluss auf die Empfänglichkeit bestimmt werden.

#### **Dank**

Die Autoren danken dem Umweltdirektorat des Kantons Waadt für die Zurfügungstellung der IBCH Daten der Stelle oberhalb des ARA-Einflusses und dem Bundesamt für Umwelt für die Finanzierung des Projektes

#### **Publikation**

Die Resultate wurden durch Bailey et al. (2018) publiziert.

#### **Literatur**

Bailey C, Rubin A, Strepparava N, Segner H, Rubin JF, Wahli T (2018). Do fish get wasted? Assessing the influence of effluents on parasitic infection of wild fish. PeerJ 6:e5956 DOI 10.7717/peerj.5956

Stucki P (2010). Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fliessgewässer. Makrozoobenthos Stufe F. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1026: 61 S.

## **Tierärztliche Betreuung von Fischen und anderen aquatischen Tieren in Großaquarien**

Verena Jung-Schroers\*, Dieter Steinhagen

Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung:**

Die tierärztliche Betreuung von Fischen und anderen aquatischen Tieren, die in einem Großaquarium gehalten werden, stellt eine besondere Herausforderung für den betreuenden Tierarzt dar.

Der Tierarzt hat es mit einer sehr großen Vielzahl an unterschiedlichen Spezies zu tun. Diese stammen in der Regel aus verschiedenen geographischen und klimatischen Regionen und aus Süß-, Brack- und Meerwasser. Kenntnisse über das physiologische Verhalten und das Erscheinungsbild dieser diversen Arten sind essentiell. Dabei muss nicht nur das jeweilige Einzeltier, sondern die Gruppe an Tieren, die zusammengehalten werden, betrachtet und beurteilt werden. Die für die Haltung der jeweiligen Arten optimalen Wasserparameter müssen ebenfalls bekannt sein.

Essentiell ist es, auf eine Quarantänehaltung von Neuzugängen hinzuwirken. Diagnostische Maßnahmen an Tieren in Schaubecken sind häufig nur mit größerem personellem und technischem Aufwand durchzuführen, da insbesondere große Tiere nur schwer gefangen werden können. Die Untersuchungen müssen in der Regel vor Ort durchgeführt werden, da ein Transport aus dem Großaquarium hinaus in den seltensten Fällen möglich ist. Müssen medikamentöse Behandlungen durchgeführt werden, so muss bekannt sein, ob alle Spezies, die behandelt werden sollen, das zu verabreichende Medikament überhaupt und auch in der notwendigen Dosierung vertragen. Zudem muss abgewogen werden, ob eine Behandlung im Schaubecken erfolgen kann, oder ob die betroffenen Tiere in ein Quarantänebecken umgesetzt werden müssen. Da in Großaquarien immer auch der Besucherverkehr bedacht werden muss, können Behandlungen, die das Aussehen des Beckens verändern, in der Regel nur in Quarantäne durchgeführt werden. Besondere Herausforderungen stellen häufig Elasmobranchier dar, da diese Tiere oft empfindlicher als Knochenfische reagieren und mit besonderer Vorsicht behandelt werden müssen. Insgesamt ist es zu empfehlen, alle Maßnahmen und Behandlungen sowie Verträglichkeit und Unverträglichkeiten zu dokumentieren, um Erfahrungswerte zu sammeln.

### Summary

Working as a veterinarian in a large scale aquarium with fish and other aquatic animals can be a challenge. The veterinarian has to deal with a very large variety of different species. These are usually from different geographic and climatic regions and from fresh, brackish and sea water. Knowledge of the physiological behavior and appearance of these diverse species is essential. Not only the individual animal, but the group of animals that are kept together, must be considered and assessed. The optimal water parameters for each species kept must also be known.

Quarantine is essential for new animals in the aquarium. Examinations of fish in the public aquaria can often be carried out only with greater human and technical effort, especially as large animals are very difficult to catch in some cases. All examinations usually have to be carried out on site, since transport from the large scale aquarium is rarely possible. If medical treatments have to be carried out, it must be known whether all the species to be treated tolerate the drug to be administered at all and in the required dosage. In addition, consideration must be given to whether treatment can be carried out in the public aquaria or whether the affected animals must be transferred to a quarantine tank. Since large aquariums always have to consider public traffic, treatments that change the appearance of the tank water can usually only be carried out in quarantine. Treatments of elasmobranchs are a particular challenge because these animals are often more sensitive than bony fish and must be treated with extra care. Overall, it is recommended to document all examination results and treatments as well as tolerability and intolerances in order to gain more experience in the field.

Die tierärztliche Betreuung von Fischen und anderen aquatischen Tieren, die in einem Großaquarium gehalten werden, stellt eine besondere Herausforderung für den betreuenden Tierarzt dar.

Anders als bei der Betreuung von Teichwirtschaften, Aquakulturanlagen oder auch privaten Fischhaltungen, hat der Tierarzt es nicht mit einer bis wenigen gehaltenen Fischarten, sondern mit einer sehr großen Vielzahl an unterschiedlichen Arten zu tun. Diese stammen in der Regel aus verschiedenen geographischen und klimatischen Regionen und aus Süß-, Brack- und Meerwasser. Hinzu kommen ebenfalls häufig gehaltene weitere Tiere, wie Amphibien, Krustaceen, Mollusken, Stein- und Weichkorallen, Anemonen und weitere. Kenntnisse über das physiologische Verhalten und das Erscheinungsbild

dieser diversen Arten sind essentiell. Dabei muss nicht nur das jeweilige Einzeltier, sondern die Gruppe an Tieren, die zusammengehalten werden, betrachtet und beurteilt werden. Es ist nicht nur die Zusammensetzung der verschiedenen Spezies entscheidend, sondern häufig auch die Anzahl und Geschlechterverteilung der Individuen innerhalb einer Spezies. Probleme können mit sehr durchsetzungsfähigen Fischarten auftreten. Andere Spezies dagegen sind besonders stressanfällig. Insbesondere für diese Tiere ist es wichtig den Besatz im Becken nach Möglichkeit konstant zu halten. Stress kann insbesondere auch bei starkem Besucherverkehr auftreten und sollte bedacht werden. Die besonders anfälligen Tiere können sehr gut als „Indikatortiere“ zur Einschätzung des Parasitenbefalls in einem Becken untersucht werden. Nicht nur Zusammensetzung der Fischarten untereinander muss passen, sondern auch die der sonstigen gehaltenen Tiere. So sind beispielsweise bei grünen Meeresschildkröten zwei männliche geschlechtsreife Tiere nur schwer gemeinsam zu halten. Zudem kann man beobachten, dass bestimmte Fischarten mit Anemonen / Korallen nicht zu Recht zu kommen scheinen. Die für die Haltung der jeweiligen Arten optimalen Wasserparameter müssen ebenfalls bekannt sein. Hinzu kommt, dass in Großaquarien ein stetiger Publikumsverkehr herrscht und dass der optische Eindruck der einzelnen Schaubecken zu jeder Zeit optimal sein sollte. Dies spielt insbesondere auch in Zusammenhang mit Behandlungen mit wasserfärbenden Medikamenten eine Rolle.

Essentiell ist es, auf eine Quarantänehaltung von Neuzugängen hinzuwirken. Während der Quarantänezeit sollten die Tiere untersucht werden um, wenn nötig, vor dem Einsetzen in ein Schaubecken behandelt werden.

Diagnostische Maßnahmen an Tieren in Schaubecken sind häufig nur mit größerem personellem und technischem Aufwand durchzuführen, da insbesondere große Tiere nur schwer gefangen werden können. Zudem muss bedacht werden, dass jeder Eingriff, wie das Fangen, das Transportieren und eventuell die Haltung in einem Quarantänebecken, mit Stress für das betroffene Tier verbunden ist und es muss abgewogen werden, ob die zu erwartenden Erkenntnisse diese Belastung gerechtfertigt. Die Untersuchungen müssen in der Regel vor Ort durchgeführt werden, da ein Transport aus dem Großaquarium hinaus in den seltensten Fällen möglich ist. Eine mobile Ausstattung ist daher genauso entscheidend wie Flexibilität und Improvisationswillen.

Müssen medikamentöse Behandlungen durchgeführt werden, so muss bekannt sein, ob alle Spezies, die behandelt werden sollen, das zu verabreichende Medikament überhaupt und auch in der notwendigen Dosierung vertragen. Im Zweifelsfall sollten Probebehandlungen weniger Tiere vorweg durchgeführt werden. Zudem muss abgewogen werden, ob eine Behandlung

im Schaubecken erfolgen kann, oder ob die betroffenen Tiere in ein Quarantänebecken umgesetzt werden müssen. Da in Großaquarien immer auch der Besucherverkehr bedacht werden muss, können Behandlungen, die das Aussehen des Beckens verändern, in der Regel nur in Quarantäne durchgeführt werden.

Besondere Herausforderungen stellen häufig Elasmobranchier dar, da diese Tiere oft empfindlicher als Knochenfische reagieren und mit besonderer Vorsicht behandelt werden müssen. Ebenso herausfordernd ist die Beurteilung von Untersuchungsergebnissen, wie zum Beispiel Blutwerten, von sehr selten in Aquarien anzutreffende Arten. Hierfür bietet es sich an bei Neuzugängen Blut abzunehmen, um Referenzwerte des jeweiligen Tieres zu haben, die im Krankheitsfall zum Vergleich herangezogen werden können.

Ziel ist bei der Betreuung von Großaquarien die Vermeidung von Krankheitsausbrüchen. Daher sollte der Zukauf nur aus bekannten Quellen erfolgen, eine strikte Quarantäne im Aquarium oder bereits im Herkunftsbetrieb sollte eingehalten werden und Untersuchungen in Quarantäne und ggf. Behandlungen sollten bei Bedarf durchgeführt werden. Der Stress durch Besucher sollte so gut es geht reduziert werden, indem zum Beispiel keine wiederholten Abendveranstaltungen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen angeboten werden und keine Änderungen der Gruppenstruktur in der Ferienzeit vorgenommen werden. Allgemeine Hygienemaßnahmen, bedarfsgerechte Fütterung (soweit bekannt) und eine so gut wie möglich artgerechte Haltung sollten immer bedacht werden.

Insgesamt ist es zu empfehlen, alle Maßnahmen und Behandlungen sowie Verträglichkeit und Unverträglichkeiten zu dokumentieren, um Erfahrungswerte zu sammeln.

## **Weiterbildung zum Diplomate of Aquatic Animal Health – Eine Konkurrenz für den deutschen Fachtierarzttitel?**

Jung-Schroers, Verena\*; Steinhagen, Dieter

Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Der Dachverband für die Spezialisierung von Tierärzten in verschiedenen Fachbereichen auf europäischer Ebene ist das European Board of Veterinary Specialisation (EBVS). Das EBVS besteht aus 26 verschiedenen Colleges, die insgesamt 35 unterschiedliche Bereiche der Veterinärmedizin abdecken. Innerhalb Europas sind mehr als 3.300 Tierärzte als European Veterinary Specialist™, also als europäische Fachtierärzte, aktiv.

Einige Colleges sind bereits seit vielen Jahren etabliert und genießen europaweit ein hohes Ansehen, wie zum Beispiel das European College of Veterinary Pathologists, das bereits seit 1995 besteht. Erst vor wenigen Jahren, im Jahre 2014, wurde das European College of Aquatic Animal Health (ECAAH) gegründet. Das Ziel des ECAAH besteht darin, zur Erhaltung und Verbesserung der Qualität der tierärztlichen Ausbildung und der Versorgung mit spezialisierten Tierärzten für die Gesundheit von in Gefangenschaft gehaltenen oder wildlebenden Fischen und anderen im Wasser lebenden Tieren (Ausnahme: Säugetiere, Vögeln, Reptilien) in ganz Europa beizutragen.

Üblicherweise werden in den ersten fünf Jahren nach Collegegründung geeignete Tierärzte nach Vorlage diverser Nachweise, wie unter anderem einer mindestens 10-jährigen Tätigkeit in und mindestens zehn hochrangigen Publikationen auf dem entsprechenden Gebiet und dem Nachweis internationaler Kooperationen als De-Facto-Diplomates, also als europäische Fachtierärzte, zugelassen. Diese sollen innerhalb der ersten fünf Jahre das College aufbauen und insbesondere Training-Zentren und assoziierte Satelliten-Zentren gründen, in denen zukünftig eine Weiterbildung von Tierärzten in Form einer Residency zum Diplomate durchgeführt werden kann. Für das ECAAH wird diese 5-jährige Frist im Jahr 2019 ablaufen. Bisher wurden 27 European Veterinary Specialists for Aquatic Animal Health aus insgesamt 9 verschiedenen europäischen Ländern als De-Facto-Diplomates anerkannt.

Im Herbst 2018 sollen insgesamt vier Training-Zentren und mehrere Satelliten-Zentren, die bereits festgelegt wurden, anerkannt werden, so dass ab Ende



2018 eine Weiterbildung auf europäischer Ebene erfolgen kann. In Deutschland soll die Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover als Training-Zentrum anerkannt werden. Die Weiterbildung im Rahmen des ECAAH beinhaltet die diagnostische Arbeit sowie Forschungstätigkeiten im jeweiligen Training-Zentrum ebenso wie Aufenthalte in den assoziierten Satelliten-Zentren, die in der Regel auf spezifische Teilbereiche, wie zum Beispiel Muschelkrankheiten, spezialisiert sind. Teil der Weiterbildung sind demnach nicht nur Erkrankungen von in Deutschland gehaltenen oder bedeutenden Fischarten, sondern auch Krankheiten von aquatischen Tieren, die in anderen europäischen Ländern eine große Bedeutung haben. Die Weiterbildung soll demnach auf europäischer Ebene erfolgen und die Diplomates des ECAAH sollen in der Lage sein, auch in anderen europäischen Ländern hochqualifizierte Diagnostik für Fische und andere aquatische Tiere anbieten zu können. Dies unterscheidet die Weiterbildung von der Weiterbildung zum deutschen Fachtierarzt, bei dem in der Regel die in Deutschland gehaltenen Fische und der diagnostische Aspekt im Vordergrund stehen. Eine direkte Konkurrenz der beiden Weiterbildungsformate ist daher aufgrund der unterschiedlichen Schwerpunktsetzung nicht zu befürchten und es ist sogar anzunehmen, dass sich beide Weiterbildungsformen gegenseitig ergänzen können.

Poster: Krankheiten - Alte Bekannte und neue Probleme

## Charakterisierung bakterieller Infektionen in Schweizer Nutz- und Zierfischen: eine retrospektive Studie von 2000 bis 2017

G. Delalay<sup>1,2</sup>, J. Berezowski<sup>2</sup>, N. Diserens<sup>3</sup> und H. Schmidt-Posthaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, Schweiz

<sup>2</sup>) Veterinary Public Health Institut, Universität Bern, Schweiz

<sup>3</sup>) Koipraxis GmbH, Ulmiz, Schweiz

### Zusammenfassung

Aquakultur ist einer der am stärksten wachsenden Landwirtschaftszweige weltweit mit einem hohen ökonomischen Wert. Bakterielle Infektionen sind wichtige Risikofaktoren, die sowohl die Aquakultur wie auch Zierfische gefährden können. Einige Bakterienspezies sowie Aquakulturformen sind bekannt als potentielle Risikoquelle, aber bis heute liegt keine umfassende Studie vor, die bakterielle Infektionen in der Schweizer Aquakultur und im Zierfischbereich untersucht hat. In der vorliegenden Studie wurden 1448 Bakterienisolate aus 1134 Einsendungen von Nutz- und Zierfischen untersucht, die im Zeitraum 2000 bis 2017 an das Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin gesendet wurden. Die Herkunft der Einsendungen und die zeitliche Entwicklung wurden dokumentiert. Bei Nutzfischen zeigte sich ein Einfluss des Farmtyps mit 6x mehr Nachweisen bakterieller Infektionen in Fischfarmen mit Biosuisse Label verglichen zu konventionellen Fischfarmen. *Flavobacteriaceae*, *Aeromonas salmonicida* und *Yersinia ruckeri* wurden am häufigsten in Nutzfischen diagnostiziert, während motile Aeromonaden und *Vibrio* spp. am häufigsten aus Zierfischen isoliert wurden. Ein Grossteil der Fischfarmen entwässert direkt in Oberflächengewässer. Weitere Forschung ist nötig, um Risikofaktoren und die Gefahr des Eintrags bakterieller Erreger und auch Antibiotikaresistenzen in freie Gewässer besser einschätzen zu können.

### Summary

Aquaculture is a rapidly growing field of food production of high economic importance. Bacterial infections are an important threat to aquaculture growth and also a common problem in ornamental fish. Some pathogenic agents and aquaculture production types are reported to be associated with increased disease. However, a comprehensive description of bacterial pathogens causing disease in Swiss aquaculture and ornamental pet fish is still missing. In this study we describe 1448 bacterial isolations originating from 1134 diagnostic laboratory submissions from farmed and ornamental fish in Switzerland for the period from 2000 to 2017. Bacterial isolations in fish submitted from organic farms were approximately six times more frequent than in conventional

fish farms. *Flavobacteriaceae*, aeromonads and *Yersinia ruckeri* were the most common isolates from aquaculture, and motile aeromonads and *Vibrio* spp. were most often isolated from ornamental fish. Further research is needed to better characterize risk factors for bacterial infections in both aquaculture and aquarium fish in Switzerland.

### Einführung

Mit dem Wachsen der Aquakultur wird Fischzucht in der Schweiz immer wichtiger (Food & Agriculture Organization of the United Nation 2012). Aber auch in Zoos, Aquarien und als Heimtiere nimmt die Anzahl Fische immer weiter zu. Bakteriell bedingte Infektionen spielen eine wichtige Rolle in der Aquakultur, einerseits aus ökonomischen Gründen (Lafferty et al. 2015), andererseits aus Tierschutzgründen (Ellis et al. 2012). In der Schweiz konzentriert sich die Aquakultur auf Salmoniden, v.a. Regenbogenforellen. *Flavobacteriaceae*, Aeromonaden und *Yersinia ruckeri* sind bekannte Pathogene in der Salmoniden-Aquakultur (Austin & Austin 2016). Motile Aeromonaden und *Vibrio* spp. wurden am häufigsten mit Zierfischerkrankungen in Verbindung gebracht (Austin and Austin 2016). In dieser Studie wurden bakterielle Infektionen in Zucht- und Zierfischen charakterisiert und mögliche Risikofaktoren identifiziert.

### Methoden

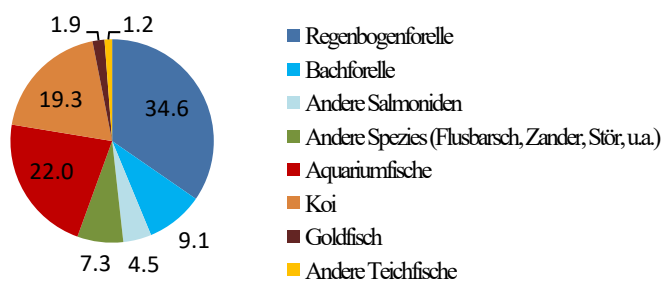
Als Grundlage für diese Studie dienten Einsendungen an das Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, bei denen eine bakterielle Infektion als Krankheitsursache identifiziert wurde. Der Datensatz umfasste 1448 Bakterien-isolationen aus 1134 Einsendungen. Diese Daten wurden auf 19 Variable untersucht, z.B. Besitzer, Postleitzahl, Fischart, Alter, Jahreszeit, Bakterienart, endgültige Diagnose, etc. Aus einer früheren Studie wurden Daten über Aquakulturtyp, Bodenbeschaffenheit, Wasserquelle, Entwässerung und Produktionsvolumen ergänzt (Diserens et al. 2013). Die Untersuchungsperiode umfasste 18 Jahre, von 2000 bis 2017.

### Resultate

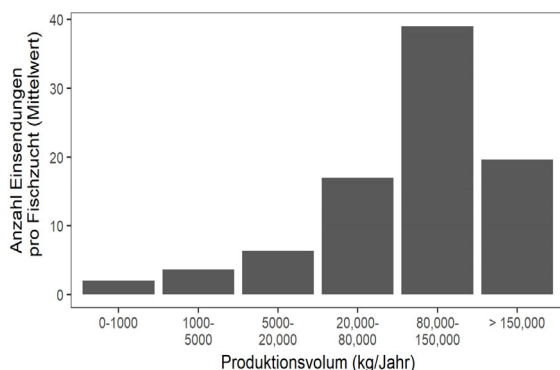
54 % der Einsendungen stammten von Zuchtfischen, 23 % von Aquarienfischen, 22 % von Teichfischen. Die meisten Fischfarmen, die Speisefische produzieren, arbeiteten mit Tanks oder Längsrinnen (77 %) und Teichen (50 %). 90 % (44 Fischzuchten) der Fischzuchten sind konventionelle Farmen, von denen 56.8 % aller Einsendungen (256 Einsendungen) stammten. 10 % (5 Zuchten) der Fischzuchten besitzen ein zertifiziertes Biolabel. 195 (43.2 %) der Einsendungen stammten aus diesen Biofarmen.

Von diesen stammten jedoch 95 Einsendungen aus einer Farm. 87 % der

Fischzuchten entwässern direkt in Oberflächengewässer. 41 % der identifizierten Bakterien gehörten zu den *Flavobacteriaceae*, 34 % *Aeromonas* spp., v.a. bewegliche Aeromonaden, lediglich 22 % der Aeromonaden wurden als *A. salmonicida*, der Erreger der Furunkulose identifiziert. Fische, die zu Speisezwecken gehalten werden, zeigten v.a. Infektionen mit *Flavobacteriaceae*, Aeromonaden, inkl. *A. salmonicida*, und *Y. ruckeri*. Zierfische waren vornehmlich mit beweglichen Aeromonaden und *Vibrio* spp. infiziert.



**Figur 1:** Verteilung der Fischarten im Untersuchungsgut, Angabe in %. Regenbogenforellen stellten die am meisten repräsentierte Art dar, gefolgt von Koi Karpfen.



**Figur 2:** Anzahl Einsendungen pro Produktionsvolumen der Fischzuchten. Die meisten Einsendungen stammten aus Fischzuchten mit einem Produktionsvolumen von 80.000 bis 150.000 kg/Jahr.

## Diskussion

Fische von Farmen mit Biostandard zeigten 6x mehr bakterielle Infektionen als Fische aus konventionellen Fischzuchten. Eine mögliche Erklärung hierfür sind strukturelle Veränderungen in den Fischbecken, z.B. natürliche Bodenbeschaffenheit mit Steinen und Versteckmöglichkeiten, die als Umgebungsaufwertung in der Biofischzucht vorhanden sind. Diese Strukturen können die Hygiene beeinträchtigen, wodurch bakterielle Infektionen begünstigt

werden können (Baynes and Howell 1993). Die meisten Fischfarmen entwässern ihr Abwasser direkt in Oberflächengewässer, ohne vorgängige Behandlung. *Flavobacterium* spp., motile Aeromonaden, *A. salmonicida* und *Y. ruckeri* wurden am häufigsten aus Aquakulturanlagen isoliert. Diese Bakterien sind jedoch auch pathogen für viele Wildfische (Apablaza et al. 2013). Somit besteht die Gefahr der Übertragung zwischen Zucht- und Wildfischen (Harvell et al. 1999).

### Danksagung

Wir danken dem Team des FIWIs für die Durchführung der Sektionen und der bakteriologischen Untersuchungen, dem Team des Instituts für Veterinärbakteriologie für die Identifizierung der Bakterienkulturen und dem Team des VPH für die hervorragende Hilfe bei statistischen Belangen.

### Referenzen

- Baynes SM, Howell BR (1993). Observations on the growth, survival and disease resistance of juvenile common sole, *Solea solea* (L.), fed *Mytilus edulis* L. *Aquaculture Research* 24(1): 95-100.
- Food & Agriculture Organization of the United Nation: The State of World Fisheries and Aquaculture (2012). FAO, Rome, IT.
- Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Powell EN, Rondeau D, Saksida SM (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science* 7: 471-496.
- Ellis T, Berill I, Lines J, Turnbull JF, Knowles TG (2012). Mortality and fish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* 2012: 189-199.
- Austin B, Austin DA (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 6 ed. Springer International Publishing, Cham, CH.
- Diserens N, Presi P, Bernet D, Schüpbach-Regula G, Wahli T (2013). Risk assessment for the design of a risk-based surveillance programme for fish farms in Switzerland (in accordance with Council Directive 2006/88/EC of the European Union). *Scientific and Technical Review* 32(3): 751-763.
- Apablaza P, Løland AD, Brevik OJ, Ilardi P, Battaglia J, Nylund A (2013). Genetic variation among *Flavobacterium psychrophilum* isolates from wild and farmed salmonids in Norway and Chile. *Journal of Applied Microbiology* 114(4): 934-946.
- Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus AD, Overstreet RM, Porter JW, Smith

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

Feldfunktion geändert

GW, Vasta GR. (1999) Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. Science. 285(5433): 1505-1510.

**Feldfunktion geändert**

## Diagnostische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von *Shewanella* spp.

Jung-Schroers, Verena<sup>\*1</sup>; Jung, Arne<sup>2</sup>; Ryll, Martin<sup>2</sup>; Bauer, Julia<sup>1</sup>; Teitge, Felix<sup>1</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;

<sup>2</sup>) Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### Zusammenfassung

*Shewanella* spp. sind Gram-negative, stäbchenförmige, bewegliche Bakterien, die im aquatischen Milieu und sowohl im Süß- als auch im Meerwasser, weit verbreitet sind. Die Bakterien sind Bestandteil der physiologischen Mikroflora von Fischen aus gemäßigten Klimazonen, kommen aber auch als Verderbniserreger in Fischprodukten vor.

Sowohl von klinisch gesunden Fischen als auch von Fischen mit Hautulzerationen können *Shewanella* spp. regelmäßig isoliert werden, was ihre mögliche Bedeutung als fakultative Fischpathogene unterstreicht.

74 Isolate von *Shewanella* spp., die von Hautulzerationen von Fischen, von der Haut klinisch gesunder Fische, aus dem Darm gesunder Fische und aus Wasserproben isoliert wurden, wurden näher untersucht. Zur Speziesidentifizierung wurden klassische biochemische Untersuchungen durchgeführt, ein Fragment des 16S rRNA Gens wurde amplifiziert und sequenziert und die Isolate wurden mittels MALDI-TOF MS und dem Sherlock Microbial Identification System (MIS), durch das eine Identifizierung aufgrund der Zusammensetzung der Fettsäureethylester vorgenommen wird, untersucht. Zusätzlich wurde die phylogenetische Verwandtschaft der Isolate sowie deren Zytotoxizität in vitro und Resistenzen gegenüber Antibiotika untersucht. Als am besten geeignete Methode zur Speziesidentifizierung stellte sich die Sequenzierung eines Fragments des 16S rRNA Gens heraus. Mittels dieser Methode konnten sechs verschiedene Spezies identifiziert werden, nämlich *S. algae* (1 Isolat), *S. baltica* (9 Isolate), *S. oneidensis* (41 Isolate), *S. putrefaciens* (3 Isolate), *S. seohaensis* (7 Isolate) und *S. xiamenensis* (13 Isolate). Alle analysierten Sequenzen wiesen mindestens eine 98,5%ige Ähnlichkeit zu Referenzsequenzen aus der Datenbank auf. Sowohl von erkrankten Fi-



schen, als auch von klinisch gesunden Fischen und aus der aquatischen Umwelt konnten unterschiedliche Spezies *Shewanella* sp. isoliert werden. Das zeigt, dass *Shewanella* spp. im aquatischen Milieu weit verbreitet vorkommen und sekundäre Pathogene für Fische darstellen können. Die Pathogenität von *Shewanella* spp., ermittelt anhand der Zytotoxizität in vitro, scheint dabei offensichtlich nicht abhängig von der spezifischen Spezies zu sein, sondern vom jeweiligen Isolat. Viele Isolate von *Shewanella* spp. wiesen multiple Resistenzen gegenüber verschiedenen antibiotisch wirksamen Substanzen auf, insbesondere Isolate, die von Fischen aus dem Handel isoliert wurden. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert in der Routinediagnostik alle isolierten *Shewanella* spp. auf das Auftreten von Resistenzen gegenüber Antibiotika zu testen.

## **Diagnostische Methoden zur Identifizierung von *Aeromonas* spp. und Untersuchungen zur Pathogenität, Zytotoxizität und Adhäsion an Fischmukus**

Jung-Schroers, Verena\*<sup>1</sup>; Jung, Arne<sup>2</sup>; Ryll, Martin<sup>2</sup>; Bauer, Julia<sup>1</sup>; Teitge, Felix<sup>1</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;

<sup>2</sup>) Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Die Gattung *Aeromonas*, die zur Klasse der Gammaproteobacteria und zur Familie *Aeromonadaceae* gehört, wird gebildet aus Gram-negativen, nicht Sporen bildenden, stäbchenförmigen, fakultativ anaeroben Bakterien. *Aeromonaden* sind ubiquitär in der Umwelt zu finden, insbesondere in aquatischem Milieu, und stellen obligatorische oder fakultativ pathogene Krankheitserreger von Menschen und Tieren dar. *Aeromonas salmonicida*, die einzige unbewegliche Spezies innerhalb der Gattung und der Erreger der Furunkulose bei Salmoniden, ist obligat pathogen für Fische, während die beweglichen *Aeromonaden* als fakultativ pathogene Krankheitserreger von Fischen, Amphibien und anderen im Wasser lebenden Tieren und auch des Menschen bekannt sind.

Es wurden 44 bereits charakterisierte *Aeromonas* spp. untersucht. Zur Identifizierung wurden biochemische Tests, 16S rRNA Sequenzierung, Sequenzierung des *gyrB* Gens, das für die B-Untereinheit der DNA Gyrase codiert, MALDI-TOF MS und das Sherlock Microbial Identification System (MIS), mit dem die Zusammensetzung der Fettsäureethylester bestimmt wird, verglichen. Zudem wurden die phylogenetische Verwandtschaft der Isolate sowie das Vorhandensein von Pathogenitätsfaktoren, ihre Zytotoxizität in vitro, ihre Adhäsion an Fischmukus und Resistenzen gegenüber Antibiotika getestet.

Am geeignetsten zur Identifizierung der Spezies stellte sich die Messung mittels MALDI-TOF MS und die Sequenzierung des *gyrB* Gens dar. Die meisten Pathogenitätsfaktoren wurden in Isolaten von *A. dharkensis*, *A. hydrophila* und *A. salmonicida* nachgewiesen und insbesondere Isolate von *A. dharkensis* und *A. hydrophila* zeigten eine große zytotoxische Aktivität. Allerdings schien die Pathogenität von *Aeromonaden* nicht generell abhängig von der

Spezies, sondern vielmehr abhängig vom jeweiligen Isolat zu sein. Viele Isolate von *Aeromonas* spp. wiesen multiple Resistenzen gegenüber antibiotisch wirksamen Substanzen auf. Dieses Ergebnis muss aufgrund der ubiquitären Natur dieser Bakterien und des Vorkommens verschiedener Pathogenitätsfaktoren als kritisch bewertet werden.

Die Anfertigung eines Antibiotogramms sollte daher eine Standarduntersuchung sein, bevor Fische mittels Antibiotika behandelt werden, um die Entwicklung resistenter Isolate zu verringern und um sicherzustellen, dass eine wirksame antibiotische Substanz gegen die nachgewiesenen Bakterien eingesetzt wird.

## Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) in Zierfischen in Deutschland

Jung-Schroers, Verena\*; Adamek, Mikolaj; Bauer, Julia; Teitge, Felix;  
Steinhagen, Dieter

Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### Zusammenfassung

Megalocytiviren gehören zur Familie der Iridoviridae und können in drei Subgruppen unterteilt werden: Infectious Spleen and Kidney Necrosis virus (ISKNV), Red Sea Bream Iridovirus und Turbot Reddish Body Iridovirus.

Infektionen mit diesen Viren können systemische Infektionen und hohe Verluste in diversen Meerwasser- und Süßwasserfischspezies verursachen. Betroffen sind Fische aus Aquakulturanlagen und Zierfische. In Deutschland wurden 2014 erstmals Infektionen mit ISKNV in Zierfischen, genauer in Platys und Skalaren, durch die Autoren dieser Arbeit beschrieben. Die infizierten Fische waren anorektisch und lethargisch und wiesen Kiemenschwellungen und Hautveränderungen auf. Die Mortalitätsrate betrug bis zu 100%. Histologisch konnten hochgradige Veränderungen in fast allen inneren Organen nachgewiesen werden. Insbesondere in Milz, Leber und Niere zeigten sich Nekrosen und eine große Anzahl hypertrophischer, in der HE-Färbung intensiv pink gefärbte Zellen, die diffus verteilt im Gewebe vorkamen.

Seit März 2016 benötigen Händler, die Fische nach Australien exportieren möchten, eine Bescheinigung über die Untersuchung und die Freiheit ihrer Fische von ISKNV. Aus diesem Grund wurde an der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover die Untersuchung mittels PCR auf ISKNV in die Routinediagnostik aufgenommen. Zwischen Anfang 2016 und Mitte 2018 wurden insgesamt Proben von 455 Fischen auf ISKNV untersucht. Dabei wurden Gewebe von 31 verschiedenen Fischarten aus 9 unterschiedlichen Familien sowohl aus Süß- als auch aus Meerwasser untersucht. Bei allen untersuchten Fischarten handelte es sich um Arten aus tropischen oder subtropischen Regionen. Die Süßwasserfischarten stammten ursprünglich aus Nordamerika, Mittelamerika, Südamerika, Südostasien, und Ostafrika. In acht der untersuchten Fische wurden ISKNV-Genomfragmente nachgewiesen. Ein *Apistogramma nijesseni*, ein *Symphysodon* sp., zwei *Betta splendens*, zwei *Colisa lalia*, ein *Xiphophorus hellerii* und ein *Xiphophorus maculatus* wurden positiv auf ISKNV getestet. In keiner der

fünf untersuchten Fischarten aus dem Meerwasser und in keinem der 412 getesteten Buntbarsche aus Ostafrika konnte ISKNV nachgewiesen werden. Bis heute gibt es keine beschriebenen Nachweise von ISKNV in ostafrikanischen Cichliden und es ist nicht bekannt, ob diese Fische empfänglich für das Virus sind. Insgesamt ist es aufgrund der teilweise sehr progressiven Verlaufsform einer ISKNV-Infektion verbunden mit teils sehr hohen Mortalitätsraten zu empfehlen, Neuzugänge von Zierfischen zunächst separat in Quarantäne zu halten und vor dem Weiterverkauf auf eine Infektion mit ISKNV zu testen

## Apoptose, Geisterzellen oder doch Einzeller?

Seibel, Henrike\*

Gesellschaft für Marine Aquakultur, Deutschland

### Zusammenfassung

Im Rahmen einer Studie wurden 4 µm dicke, histologische Schnittpräparate von in Paraffin eingebetteten Darmabschnitten von juvenilen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Forellen angefertigt und Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Während der Beurteilung der Enterozyten fielen vermehrt kreisrunde Strukturen mit einem deutlich eosinophilen Zytoplasma und ein bis zwei, selten auch fragmentiert erscheinenden, basophilen Kernbestandteilen, welche meist randständig zu finden waren, auf. Die Strukturen waren immer von einem optisch leeren Hof, kreisförmig umgeben. Teilweise schienen Zellteilungen vorzuliegen.

Mittels PAS und Giemsa ließen sich die Strukturen nicht anfärben und das Auftreten korrespondierte nicht mit einer Entzündungsreaktion, einer verstärkten Ausbildung von Vakuolen in Enterozyten oder anderen augenfälligen pathologisch-histologischen Auffälligkeiten. Es fiel jedoch auf, dass sie häufiger im Darmepithel von Fischen, welche mit einem vermehrten Anteil von Sojabohnenmehl in der Futtermittelration gefüttert wurden, auftraten.

Um was könnte es sich handeln? Für apoptotische Zellen erscheinen sie zu homogen in ihrem gesamten Erscheinungsbild und es ist fraglich, warum sich ein optisch leerer Raum gebildet hat. Auch bei Geisterzellen sind Kern und Zytoplasmadetails in der Regel nicht mehr nachvollziehbar. Diese stellen sich hier jedoch sehr deutlich dar. Einzeller hätten sich jedoch mittels Giemsa anfärben lassen sollen.

## **Immunreaktionen auf carp edema virus Infektion bei Karpfen - ein Modell für eine Immunsuppression?**

Adamek, Mikolaj\*<sup>1</sup>; Teitge, Felix<sup>1</sup>; Jung-Schroers, Verena<sup>1</sup>; Piackova, Veronika<sup>2</sup>; Gela, David<sup>2</sup>; Kocour, Martin<sup>2</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland;

<sup>2</sup>) South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydric Biosystems, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

### **Zusammenfassung**

Viren mit größeren Genomen neigen dazu, mehrere immunmodulatorische Proteine zu kodieren, die sich entwickelten, um eine erfolgreiche Replikation und Übertragung dieser Viren sicherzustellen. Pockenviren sind Viren aus einer der Familien, die am häufigsten dafür bekannt sind, Immunantworten auszuweichen. Sie sind in der Lage, den Beginn der Apoptose, die Produktion von Interferonen, von inflammatorischen Zytokinen und die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten, von B-Lymphozyten und von natürlichen Killerzellen zu modulieren. Fische sind nur für eine begrenzte Anzahl von Pockenviren empfänglich, wobei das carp edema virus (CEV) und das salmon gill poxvirus (SGPV) in einem gewissen Ausmaß untersucht werden. Die Etablierung eines Infektionsmodells mit CEV-resistenten und empfänglichen Karpfenstämmen ermöglichte uns erstmals die Untersuchung der Immunantwort von Fischen auf fischpathogene Pockenviren. Die Sterblichkeit von Koi kann innerhalb von zwei Wochen nach einer Infektion mit CEV 100 % erreichen, während bei Amur Wildkarpfen (AS) keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung bemerkt werden können. Während des Höhepunkts einer klinischen KSD (Tage 6 und 9 nach der Infektion) konnte bei Koi die Entwicklung einer schweren Leukopenie und einer Granulozytose festgestellt werden. Bei KSD-resistenten AS blieben dagegen die Ergebnisse der differentiellen Zählung von Blutzellen stabil. Dies führte zu der Frage, wie die Haupt-Immunantworten in diesen beiden Fischgruppen während einer CEV-Infektion reguliert werden. Wir haben die mRNA-Expression ausgewählter immunologischer Markergene in Kiemen (dem Zielgewebe für das Virus) und Niere (eines der wichtigsten immunologischen Gewebe von Fischen, aber mit einer sehr begrenzten CEV-Infektion) gemessen. Im Allgemeinen konnte eine Hochregulierung von pro-inflammatorischen und eine Herunterregulierung von mehreren anderen Immun-Reaktionen beobachtet werden. Das Ausmaß

der Veränderungen war in den Kiemen höher als in der Niere. Die mRNA-Spiegel von *il1b* waren extrem erhöht (über 200-fach), während die Expressionsniveaus der Gene *cd4*, *tcr a2*, *casp8-9*, *igm* 2-14-fach herunterreguliert waren. Für andere Gene: *mpo* und *cd8* blieb die Expression weitgehend unverändert. Interessanterweise reagierten die KSD-resistenten Fische nicht auf die Infektion in irgendeiner nachweisbaren Weise und nur eine Inos-Hochregulation wurde bemerkt. Diese ersten Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die klinische Entwicklung der KSD von einer Unterdrückung der T- und B-Zell-Antworten begleitet wird, die eine Ursache für die Entwicklung von Sekundärinfektionen sein könnte



## Evaluierung neuer Virusinfektionsmodelle für Zebrafische

Adamek, Mikolaj\*<sup>1</sup>; Rakus, Krzysztof<sup>2</sup>; Podlasz, Piotr<sup>3</sup>; Mojżesz, Miriam<sup>2</sup>; Way, Keith<sup>4</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup>) Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Poland

<sup>3</sup>) Department of Pathophysiology, Forensic Veterinary and Administration, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Poland

<sup>4</sup>) Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, UK

### Zusammenfassung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) gehört zu den Cypriniden, der gleichen Familie wie die drei besten Zuchtfische in der globalen Aquakultur: Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*), Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) und Karpfen (*Cyprinus carpio*). Die Produktion der karpfenartigen Fische erreichte 2015 15,3 Mio. Tonnen, was 20 % der weltweiten Aquakulturproduktion ausmacht. Mit dem bedeutenden biotechnologischen Fortschritt in der Genetik wird der Zebrafisch zu einem interessanten Modell für die Untersuchung von Immunantworten auf Infektionserreger, die bei anderen Cypriniden Krankheiten verursachen. Auf der Suche nach neuen viralen Modellen, die im Zebrafisch erforscht werden konnten, testeten wir ZF4- und SJD1-Zellen auf ihre Anfälligkeit für verschiedene Viren einschließlich der cyprinid herpesvirus 1 und 3 (CyHV-1 und CyHV-3), chum salmon reovirus (CSV), common carp iridovirus (CCIV) und common carp paramyxovirus (CCPV). Als Positivkontrollen wurden das viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) und spring viremia of carp virus (SVCV) verwendet. Die Viren CSV, CCIV, aber nicht CCP waren in der Lage, in ZF4- und SJD1-Zellen zu replizieren. Interessanterweise waren auch CyHV-1 und CyHV-3 in der Lage zu replizieren, jedoch war die Virus-mRNA auf einem sehr niedrigen Niveau und es konnte kein zytopathischer Effekt festgestellt werden, was nur eine teilweise Kompatibilität dieser Viren mit den Zellen nahelegt. Typ-I- Interferon-Antworten wurden für ausgewählte Virusmodelle gemessen. ZF4-Zellen embryonalen Ursprungs zeigten sehr schwache Typ-I-IFN-Antworten auf alle Virusinfektionen, während SJD1-Zellen (Fibroblasten von erwachsenen Fischen) eine erhöhte Typ I-IFN-Antwort gegenüber CSV, jedoch nicht gegenüber CyHV-1 und CyHV-3 zeigten. Dies könnte darauf hindeuten, dass ZF4-Zellen für

die Überwachung von antiviralen Antworten nur eingeschränkt geeignet sind. Weiterhin scheint es, dass CyHV-1- und CyHV-3-Infektionen in SJD1-Zellen auf einem sehr niedrigen Niveau verbleiben, das in den Zellen nur schwer zu detektieren ist. Basierend auf den In- vitro-Ergebnissen wählten wir CyHV-3, CCIV und CSV für in vivo Untersuchungen aus und erste Ergebnisse aus den Infektionsexperimenten mit adulten Zebrafischen werden vorgestellt.

## **Kiemenentzündungen beim Huchen (*Hucho hucho*) mit assoziierten Epitheliocystis-Strukturen im Kiemenepithel**

Steinbauer, Peter\*; Kappe, Eva

Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Senator-Gerauer-Strasse 23, 85586  
Poing, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Der auch als Donaulachs bezeichnete Huchen ist ein natürlich im Donaueinzugsgebiet vorkommender räuberischer Vertreter der Salmoniden, der in der roten Liste als stark gefährdet aufgeführt ist. Neben einigen wenigen natürlichen Reproduktionsgebieten wird der Bestand durch Besatzmaßnahmen mit in Teichwirtschaften aufgezogenen Tieren gestützt.

Seit 2014 wurde bei Untersuchungen des bayerischen Fischgesundheitsdienstes an erkrankten Huchen unterschiedlicher Altersklassen in 4 Fällen ein Krankheitsbild mit deutlichen klinischen und pathologisch-anatomischen Kiemensymptomen vorgestellt. Bei der histologischen Untersuchung der Kiemen waren Epithelhyperplasien mit teilweiser Verschmelzung der Sekundärlamellen, nekrotisierende Kiemenentzündungen sowie charakteristische, basophile Einschlüsse im Kiemenepithel nachweisbar.

Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen mittels PCR bei 2 betroffenen Huchen-Beständen im Jahr 2018 ergaben neben dem Nachweis von Epitheliocystis-Strukturen einen positiven Nachweis von *Candidatus Branchiomonas cysticola* sowie in einem der beiden Fälle zusätzlich von *Candidatus Clavoclamydia salmonicola*. Die ursächlichen Erreger für Epitheliocystis-Erkrankungen der Salmoniden werden nach jüngsten Erkenntnissen den  $\beta$ -Proteobacteria zugeordnet. Die genannten Erreger werden in Norwegen und Schottland mit multifaktoriellen Kiemenerkrankungen beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) in Verbindung gebracht.

## **Ist das common carp paramyxovirus nur ein sekundärer Erreger bei Fischen, die von koi sleepy disease betroffen sind?**

Adamek, Mikolaj\*<sup>1</sup>; Kleingeld, Dirk W.<sup>2</sup>; Teitge, Felix<sup>1</sup>; Bergmann, Sven M.<sup>3</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup>) Task-Force Veterinärwesen, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Hannover, Deutschland

<sup>3</sup>) Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, Deutschland

### **Zusammenfassung**

In den letzten 20 Jahren wurden in Deutschland, Belgien und Großbritannien mehrere common carp paramyxovirus (CCPV) Isolate von Karpfen mit Kiemen-Nekrose erhalten. Über dieses Virus und seine Verbreitung in der Umwelt ist noch sehr wenig bekannt. Mitte 2016 wurde ein Diagnoseverfahren in der Diagnostikabteilung an der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover eingeführt, das die Sammlung von diagnostischen Proben in RNAlater und das Screening auf das Vorhandensein von RNA, die spezifisch für ein nicht weiter klassifiziertes mutmaßlich common carp paramyxovirus beinhaltete. Das Virus war einige Jahre zuvor vom Friedrich-Loeffler-Institut in Deutschland isoliert worden. In insgesamt 43 Proben, die 2016 mittels einer Endpunkt-RT-PCR gescreent wurden, waren sechs positiv für die RNA des CCPV. Ein zusätzlicher Satz von 40 Proben, die in den Jahren 2009-2015 gesammelt worden waren, wurden gescreent und als negativ befundet. Die sechs CCPV-positiven Fische stammten aus vier unabhängigen Fällen. In zwei Fällen wurden Proben von Koi gesammelt, die ähnliche Symptome wie koi sleepy disease aufwiesen, und es wurde bestätigt, dass diese Fische moderate Viruslasten des carp edema virus (CEV) trugen (von  $1,13 \times 10^2$  bis  $4,70 \times 10^4$  Kopien). In den beiden anderen Fällen zeigte eine begrenzte Anzahl von Individuen aus Karpfenzuchten unspezifische klinische Anzeichen und beherbergte auch Koinfektionen mit Parasiten. Geringe Verluste (unter 10%) wurden gemeldet. Diese Fische waren negativ für CEV. Mit der Verwendung der PCR für CCPV haben wir auch bestätigt, dass es sich bei den archivierten Virusisolaten 1551 und 1609, die Ende 1990 von Fischen isoliert worden waren, die an

Kiemen-Nekrose litten, um das gleiche Virus handelte. Diese beiden Isolate wachsen in aktuellen Fibroblasten-Zelllinien (CCB, KF-1, KFC), die aus Karpfen gewonnen werden, sehr gut. Mit den aktuell vorliegenden Ergebnissen ist es schwierig, die epidemiologische Bedeutung oder eine wirtschaftliche Auswirkung des common carp paramyxovirus auf Karpfenpopulationen zu beurteilen. Das gleichzeitige Vorkommen des common carp paramyxovirus und CEV kann hypothetisch zu der Situation führen, in der das common carp paramyxovirus von Fischen isoliert wird, die mit beiden Viren infiziert waren, weil CEV in keiner der gegenwärtig verfügbaren Zelllinien repliziert.

## **Erste Nachweise des carp edema virus in Ungarn, Litauen, Kroatien und Serbien bestätigen eine sehr weite Verbreitung des Virus in Karpfenbeständen in Europa**

Adamek, Mikolaj\*<sup>1</sup>; Baska, Ferenc<sup>2</sup>; Nienius, Darius<sup>3</sup>; Radosavljevic, Vladimir<sup>4</sup>; Zrnčić, Snježana<sup>5</sup>; Brnić, Dragan<sup>5</sup>; Oraić, Dražen<sup>5</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup>) Department of Pathology, University of Veterinary Medicine Budapest, Hungary

<sup>3</sup>) National Food and Veterinary Risk Assessment Institute Vilnius, Lithuania

<sup>4</sup>) Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade, Serbia

<sup>5</sup>) Laboratory for Fish Pathology, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

### **Zusammenfassung**

Die durch eine Infektion mit dem carp edema virus (CEV) verursachte koi sleepy disease (KSD) wird von einigen als eine aufkommende Viruserkrankung in bestimmten Regionen der Welt angesehen. Vor allem in Europa wurde das Virus lange Zeit nicht nachgewiesen und ist erst in den letzten Jahren, nach seiner Entdeckung in Großbritannien, in den Fokus der Diagnostiklabore gerückt. Wir vermuten jedoch, dass sowohl das Virus als auch die Krankheit in der europäischen Karpfen - Aquakultur länger existierten und nur aufgrund einer Reihe von bestimmten Gründen, wie einer weniger dramatischen klinischen Präsentation, der Jahreszeit des Auftretens, einiger Ähnlichkeiten mit der koi hepesvirus disease (KHVD) oder einer Intoxikation mit Ammoniak, sowie der fehlenden Fähigkeit, das Virus durch Zellkultur nachzuweisen, wurde es nicht festgestellt. Ein Ergebnis, das diese Hypothese stützen könnte, wäre eine breite geographische Verteilung des Virus sowohl in den hauptsächlich karpfenproduzierenden Ländern (z. B. Ungarn) als auch in Ländern mit begrenzter Karpfenproduktion, wie Litauen, Serbien oder Kroatien. Daher wurden in diesen Ländern in den Jahren 2015-2018 Proben gesammelt und auf das Vorhandensein von CEV untersucht. Die Prävalenz von CEV war in Ungarn mit 76% am höchsten (13 CEV-positive Nachweise an 17 untersuchten Standorten), während in Litauen die Prävalenz bei 30% lag (mit 6 CEV-positiven Stellen von 20 untersuchten Stichproben). In Kroatien wurde eine Prävalenz von 14% festgestellt, wobei

6 von 44 Standorte CEV-positiv waren. In Serbien wurden Fische mit eindeutigen Anzeichen einer klinischen KSD von nur zwei Betrieben beprobt und beide Standorte wurden als CEV-positiv bestätigt. Die Unterschiede in der Prävalenz waren höchstwahrscheinlich auf die Probenahme und den Zweck der Probenerhebung zurückzuführen - in Ungarn und Serbien konzentrierte sich die Probenahme auf klinisch befallene Fische im Herbst-Winter-Frühling, wenn das Auftreten der KSD wahrscheinlicher ist, während in Litauen und Kroatien Proben im Frühling-Sommer gesammelt wurden. Phylogenetische Analysen zeigten, dass einige Virusisolate an geografisch verwandten Orten verteilt sind, z. B. konnte das gleiche Virus in benachbarten Regionen von Ungarn, Kroatien und Serbien gefunden werden. Unsere Ergebnisse zusammen mit Ergebnissen epidemiologischer Studien in Deutschland zeigen, dass CEV (vor allem aus Genogruppe I) in der europäischen Karpfenpopulation weit verbreitet ist. Daher sollte KSD bei der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen bei Karpfen bei Temperaturen unterhalb des Optimums für KHVD in ganz Europa in Betracht gezogen werden.

## Neue Zelllinien zum Nachweis von Viren in Karpfen

Felten, Martin\*<sup>1</sup>; Adamek, Mikolaj<sup>1</sup>; Rakers, Sebastian<sup>2</sup>; Gebert, Marina<sup>2</sup>; Steinhagen, Dieter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

<sup>2</sup>) Fraunhofer EMBL, Lübeck, Deutschland

### Zusammenfassung

Die Isolierung von Koi Herpes Virus und anderen karpfenpathogenen Viren, wie dem Carp Edema Virus (CEV) und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus aus infizierten Fischen gestaltet sich nach wie vor problematisch. Deshalb wurde die Eignung verschiedener Zelllinien zur Replikation und Re-Isolation für unterschiedliche Virusarten diskutiert, wobei sich besonders die Frage nach Unterschieden zwischen den verwendeten Zelltypen stellt. Sehr häufig handelt es sich bei den für die in vitro Anzucht von Viren verwendeten Zelllinien um Fibroblasten, während das Koi Herpes Virus in vivo oft in epitheloiden Zellen nachgewiesen wird, womit sich die Frage stellt, ob die schwierige Anzucht und die geringen Re-Isolationsraten mit dem Zelltyp zusammenhängen könnten.

Das Carp Edema Virus wurde bislang noch nicht erfolgreich auf Zellkultur kultiviert und repliziert. Bei in vivo Infektionen von Karpfen zeigte sich, dass das Virus vor allem Kiemenepithelzellen infiziert. Damit stellt sich auch hier die Frage, ob die Probleme bei der Kultivierung durch den verwendeten Zelltyp bedingt sind.

Zu diesem Zweck wurden neuentwickelte Zellkulturen vom Fraunhofer Institut in Lübeck bezogen und auf ihre Empfänglichkeit für Koi Herpes Virus, Carp Edema Virus und einem karpfenpathogenen Paramyxovirus geprüft. Weiterhin wurde mit Hilfe verschiedener molekularer Marker der Zelltyp der Zelllinien charakterisiert. Darüber hinaus wurde die zelluläre Immunantwort unter Infektion mit den genannten Viren untersucht. Des Weiteren wurde die als Referenzzelllinie verwendete und bereits etablierte CCB-Zellkultur in Abhängigkeit von der Passage, auf ihre Eignung zur Replikation der genannten Viren untersucht.

Insgesamt ergab die Auswertung der Ergebnisse, dass zwischen den Zelllinien deutliche Unterschiede in der Empfänglichkeit für die untersuchten Viren existieren. Leider gelang auf keiner der untersuchten Zelllinien die erfolgreiche Replikation von CEV. Die Betrachtung der Zellkontaktmarker ergab ein virus- und zelllinienspezifisches Bild aus signifikanten Aufwärts-



bzw. Abwärtsregulationen der Expression der Gene, die für diese Zellkontaktproteine codieren relativ zur Kontrollgruppe. Die Analyse der Immunantwort ergab zelllinienübergreifend den deutlichsten Anstieg von Interferon I bei einer Infektion von Zellen mit dem Paramyxovirus. Die beste Virusreplikation des Paramyxovirus erfolgte auf CCB-Zellen, während die besten KHV- Replikationsergebnisse auf den neu entwickelten ccAcer und ccApin Zellen erzielt wurden. Bei der Untersuchung der unterschiedlichen CCB-Passagen in Bezug auf ihre Fähigkeit, die Replikation von Viren zu ermöglichen, wurden erhebliche Unterschiede deutlich, sowohl zwischen den Passagen als auch zwischen KHV und dem Paramyxovirus.

## Flavobakterien in der Fischhaltung, Vorkommen, Diagnostik und Bedeutung

Julia Bauer<sup>1\*</sup>, Verena Jung-Schroers<sup>1</sup>, Felix Teitge<sup>1</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

### Zusammenfassung:

Flavobakterien kommen ubiquitär in aquatischen Lebensräumen vor und werden regelmäßig in Fischhaltungen, wie Teichen, Kreislaufanlagen und Aquarien nachgewiesen. Trotz ihres ubiquitären Auftretens sind einige Flavobakterien für Fische potentiell pathogen. Bei Flavobakterien handelt es sich um gramnegative, stäbchenförmige oder filamentöse Bakterien, die eine Länge von 5-10 µm aufweisen. Es gibt bewegliche und unbewegliche Spezies. Das Wachstumsoptimum dieser Bakterien liegt im Bereich 25 – 35°C, jedoch gibt es auch psychrotolerante und psychrophile Spezies (z.B. *F. psychrophilum*), die auch bei kalten Temperaturen gutes Wachstum zeigen (Buller, 2014). In der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover werden alle diagnostischen Proben, die mikrobiologisch untersucht werden, auch speziell auf Flavobakterien untersucht. Da diese Bakterien auf Blut- und TSB-Agar nicht sicher kultiviert werden können, erfolgt eine gesonderte Anzucht auf einem Spezialnährboden, dem Anker-Ordal-Agar. Es gibt noch weitere Selektivnährböden, die zur Kultivierung von Flavobakterien verwendet werden können, (Shieh-, Schaedler- oder Cytophaga-Agar). Eine Infektion mit *F. psychrophilum*, dem Erreger der „Kaltwasserkrankheit“ oder des „Rainbow Trout Fry Syndrome“ tritt bei kälteren Wassertemperaturen um 6 bis 15°C auf. Häufig betroffen sind Forellen, insbesondere Brütlinge, aber auch andere Fischarten, wie Karpfen, Schleien oder Aale können erkranken. Typische Symptome sind die einer systemischen bakteriellen Infektion mit Dunkelfärbung, reduziertem Allgemeinbefinden und Exophthalmus. Außerdem treten häufig eine Anämie und eine stark vergrößerte Milz auf. Infektionen mit *Flavobacterium columnare*, einem weiteren Vertreter mit pathogenem Potential für Fische, kommen häufig bei wärmeren Wassertemperaturen vor, jedoch können auch Kaltwasserfische, wie Forellen betroffen sein. Der Erreger gilt als Auslöser der bakteriellen Kiemenschwellung (Bacterial Gill Disease, BGD). Im Warmwasserbereich löst *F. columnare* häufig Flossenschäden und systemische bakterielle Infektionen aus.

### Summary:

Flavobacteria are ubiquitous bacteria in aquatic environments and are regularly isolated from fish aquaculture (e.g. ponds), recirculating systems or aquaria. Still, some species are potentially pathogenic for fish. Flavobacteria are rod-shaped or filamentous bacteria with a length of 5-10µm. There are motile and non-motile species. The growth optimum of flavobacteria is between 25 and 35°C. Still, there are psychrophilic and psychrotolerant species (e.g. *F. psychrophilum*), which show good growth at low temperatures (Buller, 2014). In the Fish Disease Research Unit of the University of Veterinary Medicine in Hannover, microbiological, diagnostic samples are always examined for flavobacteria, additionally. As these bacteria do not grow on standard agar plates (CSB, TSB), the anker-ordal agar is being used, additionally. There are a number of different agars that can be used for the cultivation of flavobacteria (shieh-, schaedler-, cytophaga-agar). Infections with *F. psychrophilum* tend to occur during cold temperatures between 6 – 15 °C. This species is the causative bacteria for “cold water disease” and the “rainbow trout fry syndrome”. Many fish species can be affected, like trout, carp, tench or eel, still trout are affected more often, especially its fry. The typical symptoms are the symptoms of a bacterial infection with dark colouring of the skin, reduced general condition and exophthalmos. Furthermore, there is often anaemia and an enlarged spleen in affected animals. Infections with *F. columnare* mostly occur during warm temperatures. Still cold-water species, like trout can be affected as well. *F. columnare* is the causative bacteria of the “bacterial gill disease“. In warm water temperatures, it often causes fin erosion and systemic bacterial infections.

In der Abteilung Fischkrankheiten der Tierärztlichen Hochschule Hannover werden alle diagnostischen Proben, die mikrobiologisch untersucht werden, auch auf Flavobakterien untersucht. Da diese Bakterien auf Blutagar und auf TSB-Agar nicht sicher kultiviert werden können, erfolgt eine gesonderte Anzucht auf einem Spezialnährboden, dem Anker-Ordal-Agar (Abb. 1).

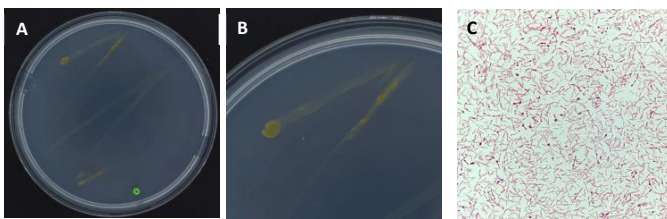
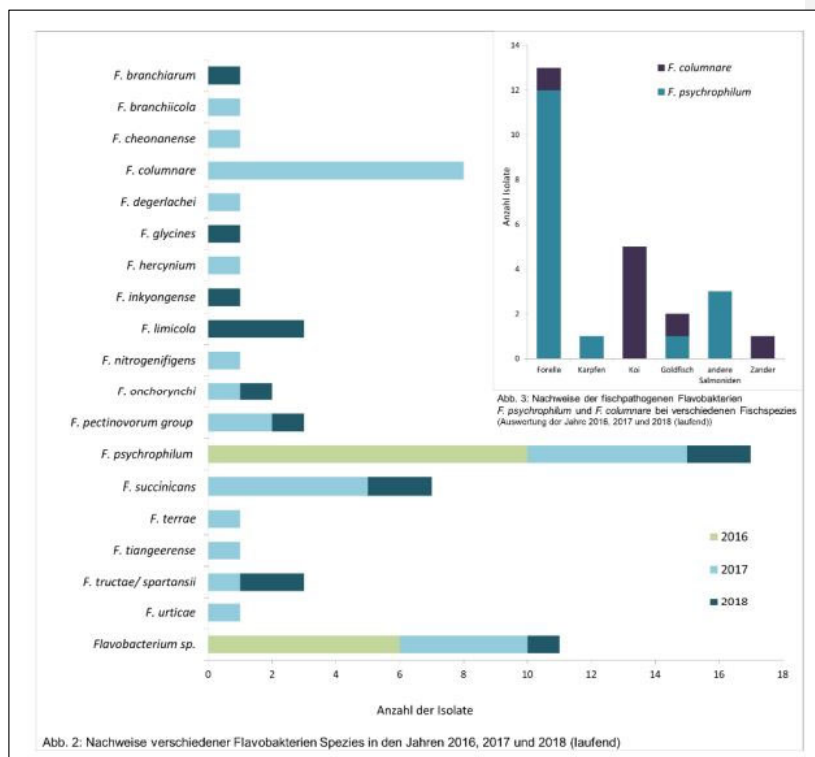


Abb. 1: *Flavobacterium psychrophilum*: A und B: Wachstum auf Anker-Ordal-Agar; C: Gramfärbung.

Die Bebrütung der Nährböden erfolgt jeweils bei der entsprechenden Wassertemperatur im Haltungssystem der Fische (idR. bei 15°C oder bei 25°C) für mindestens 4 Tage. Die Speziesbestimmung erfolgt im Anschluss mittels 16S rRNA Sequenzierung. Zusätzlich wird von jedem Isolat ein Antibiotogramm erstellt.

Aus diagnostischen Proben (Organe, Kieme, Hautwunden) wurden in den Jahren 2016 bis 2018 verschiedene Spezies von Flavobakterien nachgewiesen. Verschiedene Spezies konnten dabei von unterschiedlichen Fischarten isoliert werden (Abb. 2 und 3).



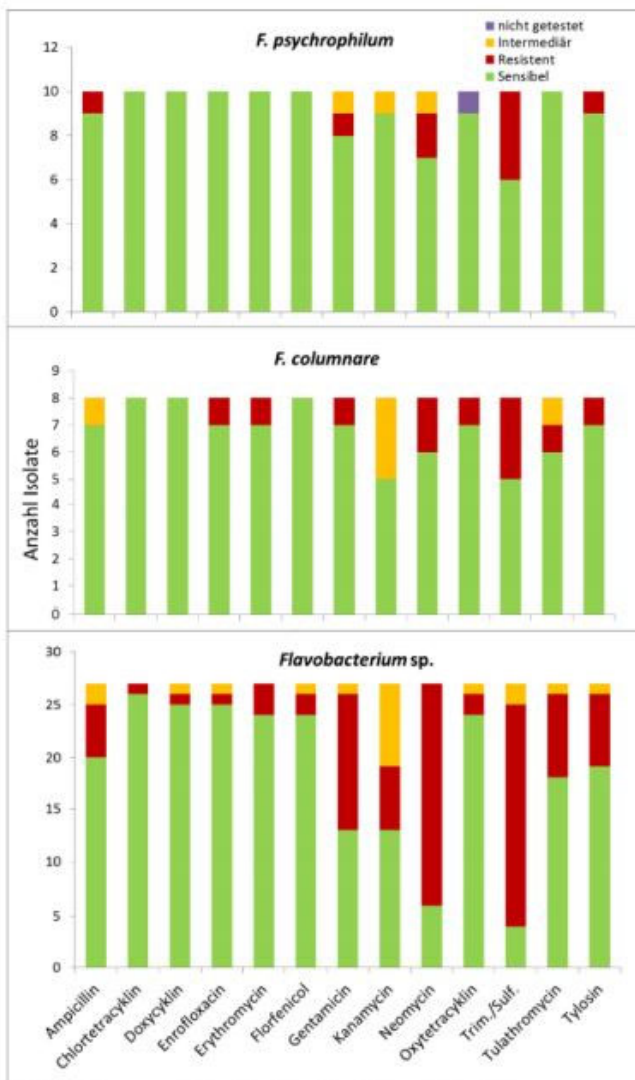


Abb. 4: Resistenzen verschiedener Flavobakterien in den Jahren 2016 und 2017

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Flavobakterien-Isolate in vielen Proben erkrankter Fische nachgewiesen werden können, häufig auch Spezies, die als potentiell pathogen eingestuft werden können, wie *F. psychrophilum* oder *F. columnare*. Hierbei konnte eine deutliche Häufung der Nachweise von *F. psychrophilum* in den Wintermonaten, oder bei kalten Wassertemperaturen, und eine Häufung von Nachweisen von *F. columnare* während der Sommermonate bzw. von Fischen, die in warmem Wasser gehalten wurden, festgestellt werden. Viele der nachgewiesenen Isolate weisen Resistenzen gegen mehrere antibiotische Wirkstoffe auf (Abb.4). Aufgrund ihres pathogenen Potentials und der vermehrt auftretenden Resistenz gegenüber antibiotischen Wirkstoffen, ist eine spezielle Flavobakterien- Diagnostik sowohl für Proben von Zierfischen als auch für Proben von Speisefischen empfehlenswert, um gezielte und tierschonende Behandlungen durchführen zu können.

#### **Zusammenfassung:**

Regelmäßige Nachweise von Flavobakterien in Verbindung mit Verlustgeschehen und Erkrankungen, auch Nachweise von pathogenen Flavobakterien sowohl aus frischen Organproben, aber auch aus eingesandten Tupferproben waren möglich.

Häufig waren Nachweise von pathogenen Spezies (v.a. *F. psychrophilum*) und anderen Spezies mit teilweise schlechter Resistenzlage (Trimethoprim/Sulfonamid oder Neomycin). Pathogene Spezies zeigten eine bessere Resistenzlage. Die Flavobakterien- Diagnostik sollte immer Teil einer mikrobiologischen Untersuchung sein und die Resistenzlage muss beobachtet werden, v.a. in Bezug auf Trimethoprim/Sulfonamid, da Borgal® das einzige in Deutschland für Fische (Forellenbrütlinge) zugelassene Antibiotikum ist.

#### **Referenzen:**

Buller, N. B., 2014. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual: Cabi, Oxfordshire/ Boston.

## ***In vitro* Studien zur Empfänglichkeit verschiedener Forellenpopulationen gegenüber dem Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Forellen (VHS) und *Yersinia ruckeri***

Julia Bauer<sup>1\*</sup>, Jakob Gährken<sup>2</sup>, Mikolaj Adamek<sup>1</sup>, Stephan Wessels<sup>2</sup>,  
Verena Jung-Schroers<sup>1</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Georg-August-Universität Göttingen, Fakultät für Agrarwissenschaften, Göttingen, Deutschland

### **Zusammenfassung:**

In der Evolution von Fischpopulationen sind genetische Anpassungen an neue Umweltbedingungen, wie an eine veränderte Nahrung, entscheidend. Insbesondere für Fische, die in Aquakulturanlagen gehalten werden, kann es zu plötzlichen Änderungen in der Rationsgestaltung durch die Gabe von Fertigfuttermitteln kommen. Da es in der Vergangenheit durch eine intensive Nutzung der marinen Fischbestände zu einer damit verbundenen Überfischung gekommen ist, ist das Angebot an Fischmehl begrenzt und es wird verstärkt an der Substitution des Fischfutters mit Bestandteilen auf pflanzlicher Basis auch in der Fütterung karnivorer Fische, wie der Forelle, geforscht. Dies kann jedoch zu schlechterem Wachstum, Auswirkungen auf die Fischgesundheit und das Tierwohl, wie auch zu einer schlechteren Umwelteffizienz führen. In einem Kooperationsprojekt soll die genetische Variabilität von Forellen für die Adaptationsfähigkeit an neuartige Rohstoffe genutzt werden, um diese für die tier- und umweltgerechte Aquakultur zu verwenden. Durch die Abteilung Fischkrankheiten wird dabei eine mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit durch den Einsatz alternativer Futtermittel anhand von möglicherweise auftretenden Haut- und Flossenschäden, sowie der Empfänglichkeit der Fische für Infektionserreger beurteilt werden.

### **Summary:**

During the evolution of fish populations, the adjustments towards environmental changes (e.g. nutritional changes in feed) are essential. Especially in fish aquaculture, sudden changes in the composition of feed can occur due to changes in the composition of the rations. Many marine fish populations are overfished due to its intensive exploitation in the past. This is a reason why fishmeal as a fish food component is rare and research on its substitution with alternative plant-based components is being promoted. This might lead to consequences regarding fish health and animal welfare as well as to a worse

environmental efficiency. The genetic variability of trout towards adaption to innovative resources will be used in a cooperative project in order to apply this capability for an animal and environment-friendly aquaculture.

The Fish Disease Research Unit will investigate a possible impairment of fish health when alternative components are used in the feed. For this matter the fish health will be evaluated by looking at skin and fin damage. Furthermore, we will assess the susceptibility towards pathogens.

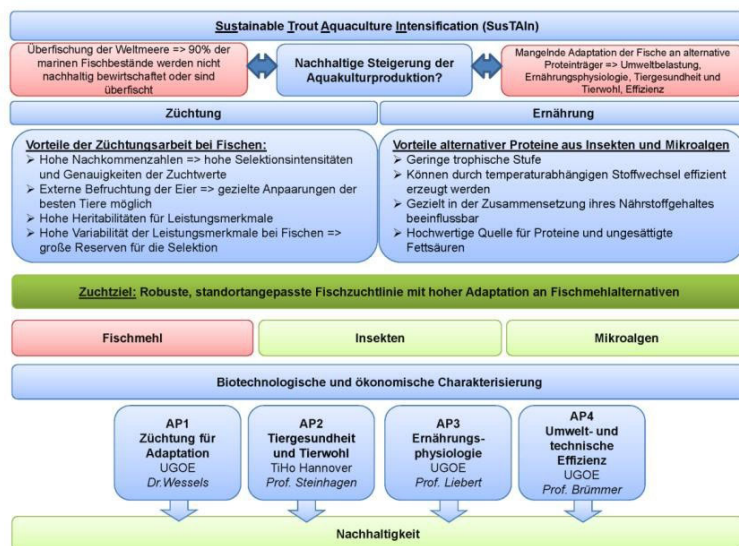


Abb. 1.: Flussdiagramm über Planung und Ziele des Projektes „SusTAIn“, gefördert durch das Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur;

<https://www.uni-goettingen.de/de/sustain/538229.html>

Der Aspekt der Empfänglichkeit der Fische für Infektionserreger konzentriert sich darauf, ob sich die Empfänglichkeit der verschiedenen Populationen von Regenbogenforellen gegenüber pathogenen Erregern bei der Fütterung mit alternativen Futtermitteln verändert. Dieses erfolgt unter anderem, indem anhand von Proben von Flossen, Kiemen und Schuppen *in vitro* die Empfänglichkeit der Fische aus den verschiedenen Herkunft für Infektionen mit *Yersinia ruckeri* (Erreger der Rotmaulseuche der Forellen) und VHSV (Erreger der viralen hämorrhagischen Septikämie der Forellen) geprüft wird. Hierzu



werden nach Abschluss eines Fütterungsversuches mit alternativen Futtermitteln Organproben gewonnen und *in vitro* mit dem jeweiligen Erreger infiziert. Nach Inkubation wird die jeweilige Infektionsstärke (Virus- / Bakteriengehalt im Medium) mittels entsprechender Verfahren ermittelt. Bei der *in vitro* Infektion von Flossengewebe und von Schuppen mit VHS erfolgt die Auswertung mittels Titration auf Zellkulturen über die Bestimmung der 50 % Tissue culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>). Die Infektionsstärke bei *in vitro* Infektion von Kiemengewebe mit *Y. ruckeri* wird mittels Verdünnungsreihe auf CSB-Agar ermittelt und die Anzahl an koloniebildenden Einheiten je Milliliter (KBE/ml) bestimmt.

Die Ergebnisse des Projektes sollen zeigen, ob einzelne Populationen von Regenbogenforellen empfänglicher gegenüber VHS oder *Y. ruckeri* sind und ob die Fütterung alternativer Futtermittel hierauf einen Einfluss hat.

#### ***In vitro* Infektion von Flossenexplantaten mit VHSV**

Die gewonnenen Flossenexplantate von Elterntieren verschiedener Forellenherkünfte wurden *in vitro* mit VHSV infiziert, um die Empfänglichkeit der Forellen für eine Infektion mit diesem Virus abzuschätzen. Nach drei Tagen *post infectionem* (*p.i.*) wurde das Zellkulturmedium beprobt und der Virusgehalt mittels Titationsverfahren ermittelt (TCID<sub>50</sub> = 50% Tissue Culture Infective Dose).

Die ermittelten TCID<sub>50</sub> der acht Forellenherkünfte weisen keinen signifikanten Unterschied im Mittelwert auf. Jedoch ist der Mittelwert bei Herkunft 4 geringgradig höher. Die Virusgehalte direkt nach Infektion (Tag 0 *p.i.*) betrugen jeweils 316 TCID<sub>50</sub> /ml Medium.

#### **Etablierung von primären Zellkulturen aus Schuppen und *in vitro* Infektion mit VHSV**

Zur Methodenetablierung wurde Schuppenmaterial von sechs kleinen und sechs großen Forellen gewonnen. Es konnten primäre Epithelzellkulturen hergestellt werden, die ebenfalls für eine *in vitro*-Untersuchung auf Empfänglichkeit der Fische für eine Infektion mit VHSV herangezogen wurden. Der gewachsene Zellrasen wurde dafür nach vier Tagen mit VHSV infiziert. Nach 2 Tagen *p.i.* wurde das Zellkulturmedium beprobt und der Virusgehalt mittels Titationsverfahren ermittelt (TCID<sub>50</sub> = 50% Tissue Culture Infective Dose).

Die Infektion der primären Schuppenkulturen mit VHSV zeigte eine deutliche Tendenz, dass das Virus in den Schuppenkulturen der kleinen Forellen besser replizierte, jedoch waren zwei der Kulturen der großen Forellen nicht auswertbar.

#### ***In vitro* Infektion von Kiemengewebe mit *Y. ruckeri***

Für die *in vitro* Infektionen wurde ebenfalls von sechs kleinen und sechs großen Forellen Kiemengewebe gewonnen und *in vitro* mit *Y. ruckeri* infiziert. Die Proben wurden bei 15°C für 48 Std inkubiert, anschließend wurde der Bakteriengehalt mittels Plattenverfahren ermittelt (KbE/ml = Kolonie bildende Einheiten pro Milliliter).

Infizierte Kiemenexplantate:

1,07E+05–1,84E+05 KbE/ml Medium (Mittelwerte) Negativkontrollen:  
1,5 – 1,52 KbE/ml Medium (Mittelwerte)

Die Ergebnisse der *in vitro* Infektion von Kiemenexplantaten mit *Y. ruckeri* zeigen, dass die Methodik gut funktioniert. Zum Hauptversuch werden noch einige Anpassungen bzgl. der eingesetzten Materialmenge, der antibiotischen Vorbehandlung der Explantate, sowie der Inkubationszeiten vorgenommen.

#### **Vergleich der *in vitro* Infektionen von Flossen, Schuppen und Kiemengewebe**

Der Vergleich der *in vitro* Untersuchungen zeigt, dass bei den kleinen Tieren sowohl höhere Werte der KbE/ ml Medium, als auch höhere Werte der TCID<sub>50</sub>/ml Medium ermittelt wurden. Die Durchführung des t-tests ergab Signifikanzwerte von P = 0,104 (Flossen), P = 0,114 (Schuppen) und P = 0,292 (Kiemen). Somit sind die ermittelten Unterschiede nicht signifikant.

#### **Zusammenfassung und geplante Untersuchungen**

Die *in vitro* Vorversuche ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Forellenherkünften, jedoch wiesen einzelne Tiere eine erhöhte Empfänglichkeit für VHSV auf; bei einer Verpaarung dieser Tiere könnten die Nachkommen eine erhöhte Empfänglichkeit für VHSV aufweisen.

Weitere *in vitro* Studien an Tieren der Forellenherkünfte und ein Infektionsversuch mit VHSV nach Fütterung mit alternativen Futtermitteln sind in Planung. Außerdem sind Untersuchungen zu Genexpressionen (z.B. Defensine, *IL1-β*, *iNOS*, *TNFα*) und Untersuchungen von Organgeweben hinsichtlich der Expression des Hitzeschockproteins 70 (*HSP70*) zur Einschätzung einer chronischen Stressbelastung geplant.

## **Ermittlung des Temperaturbereichs für eine optimale Replikation des carp edema virus der Entstehung einer klinischen koi sleepy disease Symptomatik**

Adamek, Mikolaj\*; Teitge, Felix; Jung-Schroers, Verena; Steinhagen, Dieter

Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Das Auftreten von Viruserkrankungen ist bei Fischen aufgrund ihres poikilothermen Stoffwechsels abhängig von der Temperatur. Krankheitsausbrüche erfolgen oftmals in einem Temperaturbereich, in dem das Virus von der Wirtszelle optimal repliziert werden kann. Für die meisten Viren kann dies in vitro während ihrer Replikation in Zellkulturen untersucht und dann auf epidemiologische Befunde und Beobachtungen in Tierexperimenten bezogen werden. Bei Temperaturen unterhalb des Optimalbereichs kann das Virus in Zellen repliziert werden, aber es entwickelt sich oft keine klinische Symptomatik. Bei Temperaturen oberhalb des optimalen Bereichs kann die Virusreplikation gestoppt werden, oder die Immunreaktionen des Fisches können die Infektion erfolgreich kontrollieren. Für das carp edema virus scheint der optimale Temperaturbereich relativ breit zu sein. Die Erkrankung kann bei einer Temperatur unterhalb von 10 °C auftreten. Experimentelle Infektionen bestätigten das Entstehen der Erkrankung bei 12°C, 16°C und 18°C, in der Literatur wird allerdings auch über das Auftreten der Erkrankung bei höheren Temperaturen von bis zu 25 °C berichtet, während Temperaturen von über 28°C zur „Behandlung“ der Erkrankung empfohlen werden. Da Zelllinien für die Replikation von CEV fehlen, führten wir eine Reihe von Infektionsexperimenten bei 18°C, 23°C und 29°C aus. In diesen Experimenten wurden die Viruslast und die Replikation von CEV aus der Genogruppe II in infizierten Fischen bestimmt, weil Viren dieser Genogruppe eine größere Temperaturtoleranz aufzuweisen scheinen. Erste Ergebnisse lassen vermuten, dass der optimale Temperaturbereich des Virus unter 19°C liegt. Bei 23°C ist das Virus zwar in der Lage repliziert zu werden und eine Infektion zu etablieren, dies scheint allerdings im Vergleich zum Temperaturbereich um 18°C eingeschränkt zu erfolgen. Interessanterweise ist die Virusreplikation bei 29°C stark eingeschränkt und die Fische waren in der Lage, die Infektion zu eliminieren. Diese Befunde sollen in vitro an Kulturen mit Explantaten verifiziert werden. Dann sollen auch zelluläre antivirale Immunreaktionen gemessen

werden, um zu prüfen, ob die Eliminierung des Virus auf bei höheren Temperaturen effizienter ablaufenden Immunantworten beruht.

## Erhebungen zur Verbreitung der Kaltwasser-Erdbeerkrankheit bei Regenbogenforellen (Red Mark Syndrome) in Bayern

Wimmer, Andreas\*

Tiergesundheitsdienst Bayern, Deutschland

### *Abstract:*

Die Kaltwasser-Erdbeerkrankheit der Forellen, auch Strawberry Disease oder Red Mark Syndrome (RMS) genannt, stellt ein immer größer werdendes Problem in Bayern dar. Die Anzahl von Meldungen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit roten Flecken an der Hautoberfläche ist in Bayern im Jahr 2017 stetig angestiegen. Im Allgemeinen werden bakteriell bedingte Hauterkrankungen wie die Furunkulose (*Aeromonas salmonicida*), diverse durch Flavobakterien bedingte Krankheiten (Columnarierkrankheit, Kaltwasserkrankheit), oder Erkrankungen ungeklärter Ursache wie das Red Mark Syndrome oder das Puffy Skin Disease Syndrome (PSD) bei Regenbogenforellen zu einer immer größer werdenden Herausforderung für den Fischzüchter. Besonders die wirtschaftlichen Einbußen durch nicht vermarktungsfähige Fische beim Auftreten von RMS stellen aus Sicht der Fischzucht das größte Problem dar.

Im Zuge einer Praxiserhebung werden die im Jahr 2018 in Bayern auftretenden und gemeldeten Fälle dokumentiert. Nach visueller Diagnosestellung und der Entnahme von Proben werden diese im Zentrallabor des TGD Bayern histologisch untersucht. Histologisch ist der Nachweis durch eine massive Einwanderung von Lymphozyten in die gesamte Haut, manchmal bis in die Epidermis kennzeichnend (Differential characterization of emerging diseases of rainbow trout; Oidtmann et al. (2013). Galeotti et al. (2017) beschreibt auch einen PCR-Nachweis von Rickettsien zur Verifizierung von davor durchgeführten histologischen Untersuchungen.

Weiters werden bei jedem auftretenden Fall umweltbezogene Daten (Monat und Jahreszeit) und die vorherrschende Wassertemperatur erfasst, ebenso fischbezogene Daten wie das Stückgewicht der Fische und die Herkunft der Setzlinge oder des Eimaterials. Auch wird erfasst ob die Fische bereits mit Antibiotikum (Doxycyclin) vorbehandelt wurden oder ob Spontanheilungen ohne Therapie aufgetreten sind.

Das Poster wird bereits in Bayern erhobene Daten zeigen und einen Ausblick des Projekts geben. Auffallend ist, dass alle Fische bei denen RMS in Bayern

aufgetreten ist, nicht in Bayern erzeugt worden sind sondern als Import-Ware (Eier oder Setzlinge) aus EU Nachbarstaaten gekommen sind

#### **Literatur**

Galeotti M, Manzano M, Beraldo P, Bulfon C, Rossi G, Volpatti D, MagiGE. (2017). Ultrastructural and biomolecular detection of Rickettsiales-like organisms in tissues of rainbow trout with Red Mark Syndrome. *Journal of Fish Diseases*, 40(7):907-917.

Oidtmann B, LaPatra SE, Verner-Jeffreys D, Pond M, Peeler EJ, Noguera PA, Crumlish M (2013). Differential characterization of emerging skin diseases of rainbow trout—a standardized approach to capturing disease characteristics and development of case definitions. *Journal of fish diseases*, 36(11):921-937.

## ***Myxobolus koi* - erfolgreiche Therapie bei Tosai (*C. carpio koi*) mit Toltrazuril**

Martin Kammerer<sup>1</sup>, Sandra Lechleiter<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Konishi Europe GmbH Fabrikstr. 9-11, D-74232 Abstatt

<sup>2</sup>) FISHCRE Fuhrmanstr. 4, D-75305 Neuenbürg

### **Zusammenfassung**

In den Jahren 2015 bis 2018 konnte durch die Therapie der infizierten Tosai mit Toltrazuril (Baycox 2,5%, Fa. Bayer) die Verlustrate deutlich gesenkt werden. Die Behandlung reduziert die Befallsrate, ist aber nicht 100% wirksam. Die Medikation über das Futter ist effektiv und belastet die Umwelt weniger als Bäder. Sie ist wirtschaftlich, da keine großen Mengen des Medikamentes eingesetzt werden müssen.

Die erfolgreiche Behandlung von *M. koi* über das Futter bei *Cyprinus carpio koi* ist in der uns vorliegenden Literatur bisher nicht beschrieben worden.

### **Abstract**

Small Tosai from a koi farm in the district Hiroshima were regularly infected in the early summertime with a nodular disease in the gill tissue. The causative organism was diagnosed as *Myxobolus koi* KUDO (1919). Mortalities up to 80-100% occurred and a suitable therapy was urgently required. The treatment via food with Toltrazuril (Baycox 2,5% BAYER) for one week solved the problem and reduced the losses under 10% of the offspring.

### **Einleitung**

Bei der Aufzucht von Tosai in Naturteichen der Konishi Koifarm, Hiroshima, Japan, entstanden im Frühsommer ab Mai regelmäßig Verluste durch eine Knötchenkrankheit der Kiemen. Die Befallsraten lagen bei der ersten Vermehrung im Mai/Juni bei 0-4% und bei der zweiten Vermehrung im August/September bei 70-100%. Die befallenen Koi sind dann etwa 5 cm lang. Sie wachsen schlecht, da sie erhebliche Atmeprobleme haben und sterben nach kurzer Zeit. Nur wenige überleben eine starke Infektion der Kiemen.

### **Ziel**

Ziel der Untersuchung und Behandlung war die Reduktion der Verluste durch eine geeignete Therapie. Daneben wurden Massnahmen zur Krankheitsprophylaxe durch ein geeignetes Teichmanagement erarbeitet.

### Material und Methoden

Es lagen zur Untersuchung frisch gestorbene und wegen eines massiven Befalls euthanasierte Koi von 5-8 cm Länge vor. Die Kiemen zeigten makroskopisch weiße, ca. 3-4 mm große Knötchen im Kiemenepithel. In nativen Quetschpräparaten erwiesen sich die Knötchen als dichte Ansammlung von Myxosporen. Nach Anfärbung auf Test Simplets konnten die Sporen deutlich sichtbar gemacht werden. Sie wurden als typisch für eine Infektion durch *Myxobolus koi* bestimmt (1). Neuere Untersuchungen (2) betonen die morphologische Ähnlichkeit mit *M. toyamai* und *M. longisporus*. Eine Neubeschreibung wurde auf Grund der molekularen Charakteristika vorgeschlagen. Unsere morphologische Diagnose ist daher nicht gesichert.

### *Myxobolus koi* Kudo (1919)

Der Erreger gehörte zu den Myxoporidae, Klasse Myxosporidia, Genus *Myxobolus*. Er besitzt eine Affinität zum Bindegewebe der Kiemenepithelien von *Cyprinus carpio*. LOM und DYCOVA erwähnen, dass der Erreger mit Koi nach Großbritannien eingeführt wurde. Die beiden Sporen sind schlank tropfenförmig, Größe L 15 x W 8,5 µm, die Polkapseln langgezogen und gleich groß (8 x 2,7 µm). Die Pathogenität von *M. koi* wurde von HOSHINA 1952 beschrieben. Die Sporen sollen ohne Wirt ein Jahr überlebensfähig sein.

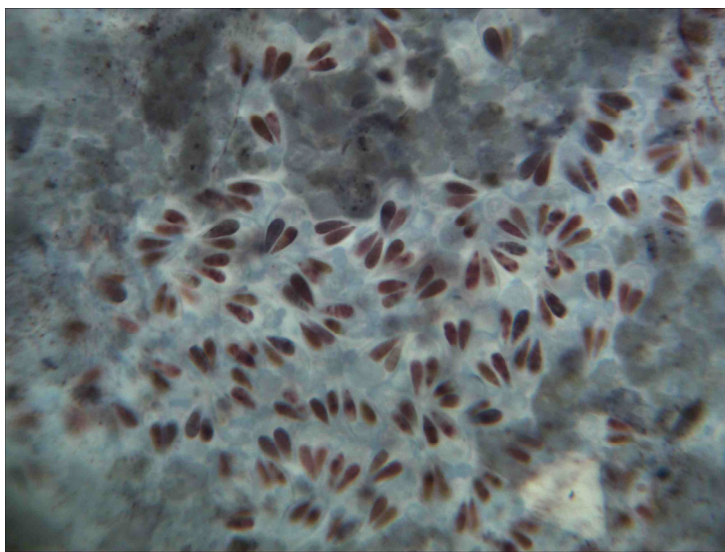


Bild 1: *Myxobolus koi* gefärbt mit Test Simplets.



### Lebenszyklus und Zwischenwirte

Yokoyama et. al. (1997) fanden zwei verschiedenen Formen von *M. koi* in den Kiemen, eine in den Primärlamellen (Plasmodien) und eine kleinere in den Sekundärlamellen von Karpfen. Hier wurde auf eine saisonal unterschiedliche Prävalenz der beiden Formen hingewiesen. Die größeren Plasmodien erscheinen etwa 6 Wochen vor den kleineren und sind für die Fische pathogener (3). Der Lebenszyklus, die Infektionsroute und etwaige Zwischenwirte sind von *M. koi* ist nicht geklärt (4).

### Naturteiche und Wasserversorgung

Die Aufzuchtteiche sind bei jeder Vermehrung die gleichen, die Brütlinge werden in einer Größe von durchschnittlich 5-8 cm Körperlänge in vorbereitete Wachstumsteiche verbracht und die Teiche für die Brut mit einer zweiten Vermehrung besetzt.

Die Wasserversorgung erfolgt über einen Bach, der am gegenüberliegenden Hang entspringt und über eine Strecke von etwa 3-4 km an der Oberfläche fließt. Es gibt einen Oberlieger, einen privaten Koiteich. Im Bach leben Kleinfische, jedoch keine Koi.

### Therapie

Die Koi werden für den 1. Sortiervorgang abgefischt und selektiert. Sie erhalten danach ein Futter, das mit 1g/kg Toltrazuril angereichert wird und für eine Woche gefüttert wird. Die Dosierung stammt aus einer mündlichen Information des TGD Grub aus dem Jahr 2002. In dieser Dosierung war Baycox® 2,5% von Bayer erfolgreich gegen *Ichthyophthirius multifiliis* übers Futter eingesetzt worden. Schmal et. al. hatten in verschiedenen Veröffentlichungen die Wirksamkeit von Toltrazuril und HOE 092V, ein nahe verwandtes Triazin, gegen diverse Ciliophora, Mikrosporea, Myxozoa und Helminthen berichtet. Es wurden überwiegend Badebehandlungen durchgeführt (5-8). Die Wirkung besteht aus einem Eindringen des Wirkstoffs in die Zellen, und der Unterdrückung der Pyrimidinsynthese und Zellteilung. Sie wirkt gegen alle Stadien der verschiedenen Parasiten (10).

Die Naturteiche werden, sofern dies wegen der vorhandenen Wassermenge möglich ist, mit Kalkstickstoff (Perlka®) in einer Dosierung von 20 kg pro 100 Quadratmeter vor dem Auswintern behandelt.

Über eine UV-Desinfektion des Wassers des Baches vor dem Eintritt in die Teichanlage wurde diskutiert, sie ist derzeit nicht rentabel.

### Dank

Wir bedanken uns bei Makoto Konishi, Konishi Koifarm, Hiroshima, für die Übermittlung der Daten und die Genehmigung für die Veröffentlichung der

Behandlung. Prof. Horst Kaiser, Horst Kaiser, Department of Ichthyology and Fisheries Science, Rhodes University, South Africa danken wir für die wertvolle Unterstützung bei der Literaturercherche.

#### Zitierte Literatur

- (1) Lom J, Dykova I (1992). Protozoan Parasites of Fishes. Elsevier, 204-220.
- (2) Camus AC, Griffin MJ (2010). Molecular characterization and histopathology of *Myxobolus koi* infecting the gills of a koi, *Cyprinus carpio*, with an amended morphological description of the Agent. Journal of Parasitology 96:116–124
- (3) Yokoyama H, Inoue D, Kumamaru A, Wakabayashi H (1997). *Myxobolus koi* (Myxozoa: Myxosporea) forms large- and small-Type ‘cysts’ in the gills of common carp. Fish Pathology 32:211–217
- (4) Braun SD (2017). Myxosporean infections of common carp (*Cyprinus carpio*). Dissertation, Department of Pathology, University of Veterinary Medicine, Universität Budapest
- (5) Schmahl G, Raether W, Mehlhorn H (1992). Hoe 092 V, a new triazine derivative effective against a broad spectrum of fish and crustacean parasites. Parasitol Res 78:702–706
- (6) Schmahl G, Obiekezie A, Raether W (1993). Treatment of fish parasites. 11. Morphogenesis of *Henneguya laterocapsulata* Landsberg, 1987 (Myxosporea, Myxozoa), and the effects of a new triazine derivative, HOE 092 V, on its developmental stages: a light and electron microscopy study. Parasitology research 79:667–674
- (7) Schmahl G, Senaud J, Mehlhorn H (1991). Treatment of fish parasites Effects of sym. triazinone (Toltrazuril) on developmental stages of *Henneguya* sp. (Myxosporea, Myxozoa): A Light and Electron Microscopic Study. Archiv für Protistenkunde 140:83–94
- (8) Schmahl G, Mehlhorn H, Taraschewski H (1989). Treatment of fish parasites: 5. The effects of sym. triazinone (Toltrazuril) on fish parasitic ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis* FOUQUET, 1876, *Apiosoma amoeba* Grenfell, 1884, *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1831). European Journal of Protistology 24:152–161
- (9) Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyanis P, Vatsos I (2004). Efficacy and toxicity of orally administered anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. Diseases of Aquatic Organisms 62, 217–226 (2004).

## Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener *Vibrio* spp. aus Kreislaufanlagen für tropische Riesengarnelen (*Litopenaeus vannamei*)

Julia Bauer<sup>1\*</sup>, Felix Teitge<sup>1</sup>, Lisa Neffe<sup>1</sup>, Mikolaj Adamek<sup>1</sup>, Arne Jung<sup>2</sup>, Christina Peppler<sup>3</sup>, Dieter Steinhagen<sup>1</sup>, Verena Jung-Schroers<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>2</sup> Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland

<sup>3</sup> Polyplan GmbH, Bremen, Deutschland

### Zusammenfassung:

Vibrionen wie *V. parahaemolyticus* und *V. harveyi* sind als Verursacher von Erkrankungen und Ausfällen bei der Produktion von tropischen Riesengarnelen in Aquakultur bekannt. Untersuchungen von *Vibrio*-Isolaten aus Wasserproben verschiedener Haltungssysteme zeigen, dass diese *Vibrio* spp. auch in geschlossenen Kreislaufanlagen vorkommen. Inwieweit diese ein Gefährdungspotential darstellen, wurde durch Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren analysiert. Hierzu wurden Pathogenitätsfaktoren ausgewählt, die nachweislich bei Vibrionen für eine erhöhte Pathogenität verantwortlich sind. Hierzu gehören Faktoren, die bei *V. cholerae* zur erhöhten Pathogenität einiger Isolate beitragen, wie die *Vibrio cholerae* Pathogenitätsinsel (*VPI*).

Außerdem wurden verschiedene Hämolysine untersucht, da diese nachweislich die Pathogenität von Vibrionen erhöhen können. Hierbei wurden das *Vibrio Harveyi* Hämolysin, das *Vibrio fluvialis* Hämolysin und drei Hämolysine, die bei *V. vulnificus* identifiziert wurden untersucht.

Da auch die Motilität von Bakterien eine große Rolle bei ihrer Pathogenität spielt, wurden sowohl die Beweglichkeit der verschiedenen Isolate beurteilt als auch einige Untersuchungen zum Vorhandensein von Flagellinen durchgeführt, die zur Motilität beitragen, aber auch die Anhaftung an Epithelien erleichtern können.

### Summary:

*Vibrio* sp. like *V. parahaemolyticus* or *V. harveyi* are causative bacteria of disease in cultured shrimps. The investigations on isolates from different recirculating aquaculture systems show that potentially pathogenic *Vibrio* spp.

can be found in these systems. The potential risk that derives from these isolates can be estimated by analysing different pathogenicity factors. Therefore, different pathogenicity factors were chosen that are known to induce an elevated pathogenicity in certain *Vibrio* spp..

These include factors that elevate the pathogenicity of *V. cholerae*, like the *Vibrio cholera* pathogenicity island (*VPI*). Furthermore, different hemolysins were analysed. It is proven that hemolysins can elevate the pathogenicity of certain isolates. The *Vibrio harveyi* hemolysin (*vhh*), the *Vibrio fluvialis* hemolysin (*vfh*) and three hemolysins that were identified in *vulnificus* isolates were analysed.

In addition, motility plays an important role in the pathogenicity of bacteria. Therefore, the motility of the isolates was analysed and we investigated the presence of different flagelline gene loci as these contribute to motility in bacteria and can promote the adhesion on mucous membranes.

Untersucht wurden Wasserproben aus drei Kreislaufanlagen für *L. vannamei*. Hierbei waren zwei Anlagen in denen die Tiere keine Krankheitsanzeichen zeigten. In der dritten Anlage gab es zum Zeitpunkt der Probennahme ein hgr. Verlustgeschehen.

- Anzucht der Wasserproben auf Columbia-Sheep-Blood (CSB)- Agar (mit und ohne 2% Salzzusatz)
- Bestimmung der Gesamtkeimzahlen im Plattenverfahren
- Subkultivierung aller morphologisch unterschiedlicher Kolonien, DNA Extraktion
- Identifizierung mittels PCR und anschließender Sequenzierung des für die Uridylat-Kinase codierenden Gens *PyrH*

Untersuchung verschiedener Gene, die als Pathogenitätsfaktoren beschrieben sind:

- **Flagelline:** Flagelline B und C von *V. harveyi*; Flagelline B, C und D von *V. vulnificus*
- **Hämolysine:** *Vibrio harveyi* Hämolysin (*vhh*), *Vibrio fluvialis* Hämolysin (*vfh*), und thermostabile, direkte Hämolysin (*TDH*) und das *TDH*-related Hämolysin (*TRH*) von *V. parahaemolyticus*
- Pathogenitätsfaktoren, die bei *V. cholerae* die Pathogenität beeinflussen. Hierzu gehört die *Vibrio* Pathogenicity Island (*VPI*), der Master-Regulator *ToxR* und das Membranprotein *ToxS*.
- Weitere Faktoren, die bei *V. parahaemolyticus* zu erhöhter Pathogenität

führen. Hierzu gehören die Typ 6 Sekretionssysteme 1 und 2 (*T6SSI*, *T6SS2*)

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine hohe Anzahl von potentiell pathogenen *Vibrio* sp. in zirkulierenden Aquakultursystemen für *Litopenaeus vannamei* vorkommen. Dabei konnten *Vibrio* spp., die positiv auf Pathogenitätsfaktoren getestet wurden, sowohl in Anlagen, die mit klinisch gesunden Garnelen bestückt waren, als auch in Anlagen, die mit erkrankten Garnelen besetzt waren, nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen Spezies an *Vibrio* spp. unterschieden sich jedoch zwischen diesen Systemen und nur drei Spezies von *Vibrio* spp. konnten sowohl in Anlagen mit gesunden als auch in Anlagen mit kranken Tieren gefunden werden (*V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus*). Die Gesamtkeimzahlen unterschieden sich in den drei Anlagen nicht signifikant und lagen im Bereich  $7.1 \times 10^3$  bis  $7.3 \times 10^6$ . In *V. campbellii* Isolaten konnte keiner der untersuchten Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen werden. Der Anteil an potentiell pathogenen Vibrionen war mit 53 % in der Anlage mit Verlustgeschehen am höchsten.

#### **Zusammenfassung:**

- Speziesidentifikation bei der routinemäßigen Überwachung von Aquakulturanlagen für die kommerzielle Produktion von Garnelen ist essentiell wichtig
- Untersuchungen zum Vorkommen von Pathogenitätsfaktoren ist nicht geeignet für die Prävention von Krankheiten in RAS
- Maßnahmen im Krankheitsfall
  1. eine sichere Identifizierung,
  2. Erstellung eines Resistenzprofiles und
  3. eine hierauf abgestimmte Behandlung der erkrankten Tiere
  4. In Anlagen mit einer erhöhten Anzahl pathogener Bakterien sollte eine Bestandsberatung hinsichtlich der Hygiene und der „Stabilität des Systems“ erfolgen.

F

Poster: Fish Welfare

## **Wirkung der Wasserozonisierung auf die Zuchtumgebung, die Produktion, den Gesundheitszustand und die Qualität von Fischfleisch bei Zandern (*Sander lucioperca*) im Rezirkulationssystem (RAS)**

Kolarova, Jitka<sup>\*1</sup>; Sancho Santos, Eugenia<sup>1</sup>; Schmidt-Posthaus, Heike<sup>2</sup>; Steinbach, Christoph<sup>1</sup>; Srara, Alzbeta<sup>1</sup>; Velisek, Josef<sup>1</sup>; Cizek, Alois<sup>3</sup>; Kristan, Jiri<sup>1</sup>; Policar, Tomas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Czech Republic, Tschechische Republik

<sup>2</sup>) Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern, Schweiz

<sup>3</sup>) University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

### **Zusammenfassung**

Für die weitere Entwicklung der tschechischen Fischerei, die zur Zeit auf Karpfenzucht konzentriert ist, ist es sehr wichtig, eine ausgewogene und qualitativ hochwertige Ganzjahresproduktion von Fischarten wie Zander (*S. lucioperca*) in industrielle Produktionsbetriebe einzuführen (Policar et al., 2013; 2014). In der intensiven Zanderzucht werden häufig Ektoparasiten diagnostiziert, erhöhter Gehalt organischer Stoffe im Wasser, höhere Bakterien Konzentrationen im Wasser oder eine generelle schlechte Wasserqualität (Kestemont et al., 2000; 2003; Wang et al., 2009). Das Ziel der Langzeitbeobachtung (231 Tage) war es, die Wirkung der Wasserozonisierung in Rezirkulationsanlagen (RAS) auf die zoohygienische Zuchtumgebung, Aufzuchteffizienz, das Wohlergehen der Fische und anschließend auf die Optimierung der Intensivzucht zu bewerten.

Zwei identische Zucht-RAS wurden für das Experiment in einer Pilotanlage ausgewählt. In jedem RAS wurden 4 Tanks (Wasservolumen 1500 Liter) für den Test mit 500 Zandern (W = 9,15 g; TL = 103 mm) verwendet. In den Wasserreservoirs eines RAS wurde das Wasser periodisch (6 Stunden pro Tag) mit Ozon über einen Ozongenerator mit einer Produktion von 10 g Oz / h behandelt (d.h. 60g Oz / Tag). Die Kontrollbehälter des zweiten RAS

hatten die gleichen technischen Bedingungen, jedoch ohne Wasserozonisierung. Während des Versuches wurden der Ernährungs- und Gesundheitszustand der Fische und die chemischen und physikalischen Wasser-Parametern regelmäßig untersucht.

Es wurde festgestellt, dass die Wasserozonisierung in RAS die Fischgesundheit und den Ernährungszustand, die Nährstoffumwandlung und die Frequenz der therapeutischen Eingriffe in der Fischzucht nicht beeinflusste. Im Gegenteil, die Wasserozonisierung wirkte sich positiv auf das kumulative Überleben, die Wasserqualität, das Auftreten von Flossenschäden, die sensorischen Fleischeigenschaften und die Prävalenz von bakteriellen und Protozoen Infektionen aus. Aufgrund der Ergebnisse unseres Monitorings kann die Verwendung von Wasserozonisierung in RAS bei hoher organischer Belastung und Wassertrübung empfohlen werden.

#### Dank

This study was supported by project NAZV QK1820354 and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic - projects „CENAKVA“(No. CZ.1.05/2.1.00/01.0024) and “CENAKVA II“ (No. LO1205 under the NPU I program)

#### Referenzen

- Kestemont P, Mélard C (2000). Aquaculture (Chapter 11). In: Craig JF (Ed.), Percid Fish – Systematics, Ecology and Exploitation. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 191–224.
- Kestemont P, Jourdan S, Houbart M, Mélard C, Paspatis M, Fontaine P, Cuvier A, Kentouri M, Baras E (2003). Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture* 227:333–356.
- Polícar T, Stejskal V, Křišťan J, Bossuyt J, Bláha M (2013). The effect of fish size and density on the weaning success in pond-cultured pikeperch (*Sander lucioperca* (L.)). *Aquaculture International* 21(4):869 – 882.
- Polícar T, Křišťan J, Blecha M, Vaniš J (2014). Adaptace a chov juvenilních ryb candáta obecného (*Sander lucioperca* L.) v recirkulačním akvakulturním systému (RAS). *Edice Metodik, FROV JU Vodňany*, č. 141:8 – 35.
- Wang N, Xuliang X, Kestemont P (2009). Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture* 289:70–73.



## Freies Cortisol im Wasser als Marker zur Stressbestimmung in der Aquakultur

Helmut Wedekind<sup>a</sup>, Andre Meriac<sup>a</sup>, Kai Lübke<sup>a</sup>, Johann Rieder<sup>b</sup>

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft:

<sup>a</sup> Institut für Fischerei, <sup>b</sup> Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungs-  
wesen

### Zusammenfassung

Die Fischzuchtpraxis, Verbraucher und Wissenschaft benötigen für eine ziel-führende Diskussion zum Tierwohl in der Aquakultur verlässliche Daten zu Stress in der Fischhaltung. Mit diesem Beitrag präsentieren wir Erfahrungen mit der Bestimmung von Cortisol als Stressmarker in Ablaufwasser von Fischzuchten. Diese nicht-invasive Bestimmung des Stresshormons kann uns objektive Daten zur Belastung von Fischen in der Aquakultur liefern. Allerdings sind für die Bestimmung der spezifischen Cortisolproduktionsraten genaue Angaben zum Haltungsvolumen, zur Fisch-Biomasse und der Wasserdurchflussmenge erforderlich. Weil die Cortisolkonzentrationen im Ablaufwasser sehr gering sind, gestaltet sich das Analyseverfahren als aufwändig. Unabhängig davon hat dieser Ansatz das Potential, objektive Daten zu Stress in Fischen unter verschiedenen Haltungssituationen zu liefern.

### Summary

In the context of aquaculture production, consumer expectations, and science reliable data on stress under farming conditions are necessary for a proposeful discussion on welfare in fish husbandry. With this article experiences with analyses of cortisol in pond effluents are presented. The non-invasive measurement of this hormone and its specific excretion has the potential to produce objective data on stress in fishes. However, accurate information on the volume of holding facilities, fish biomass, and water exchange rate are necessary. Due to the fact, that cortisol-concentration in aquaculture effluents turned out to be very low, the methodology is quite extensive. Nevertheless, this approach is promising for its further use under different farming conditions.

### Einleitung

In Anbetracht der rapiden Entwicklung der Aquakultur in Deutschland rückt das Tierwohl in der kommerziellen Fischzucht mehr und mehr in den Vordergrund (Wedekind 2014). Gerade semi-intensive und intensive Produkti-

onssysteme stehen oft in der Kritik für hohe Besatzdichten und „unnatürliche“ Aufzuchtbedingungen. Für eine unvoreingenommene und zielführende Diskussion zum Tierwohl in der Aquakultur fehlen oft objektive Parameter zur Beurteilung von Stress unter Praxisbedingungen.

Neben generellen Indikatoren zum Tierwohl wie verschiedene Parameter zur Beschreibung der Haltungsbedingungen, Verhalten, Futteraufnahme, Wachstum oder äußere Fischqualität (Kleingeld et al. 2018) wurde in der Vergangenheit das Stresshormon Cortisol als spezifischer Marker für Belastungen bei Fischen verwendet (z.B. Wedekind & Schreckenbach 2003). Allerdings ist dies mit invasiven Blutentnahmen verbunden, die die Haltungssituation durch den Eingriff verändert und Stress bewirkt. Als nicht-invasive Alternative zur Blutentnahme stellt die Analyse von freiem Cortisol im Haltungswasser eine weitere Möglichkeit dar, da die Korrelation von Stress, Cortisol im Blut, und die Cortisolabgabe über die Kiemen ins Wasser i.d.R. gegeben ist. Somit ist es möglich, das Cortisolniveau im Ablaufwasser eines Produktionssystems als Parameter zur Stressbestimmung zu verwenden, ohne Störungen im System zu verursachen. Entsprechende Untersuchungen von Ellis et al. (2004) zeigen, dass wiederholte, akute Stressreize die Cortisolfreisetzungsrate von 40 auf bis zu 6700 ng/kg/h steigern können. Die Cortisolbestimmung im Haltungswasser kann auch als mögliches Warnsignal für präklinische Erkrankungen dienen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass akute Stresssituation mit dieser Methode reproduzierbar beschrieben werden können (Lübke et al. 2014). Als nächster Schritt sollte versucht werden die Fischhaltung unter Normalbedingungen zu untersuchen, um damit möglicherweise auch chronische Belastungen während der Aufzucht von Fischen nachweisen zu können.

#### **Material und Methoden**

Die Untersuchung wurde im Rahmen eines umfassenden Forschungsprojektes in der Teichanlage des Instituts für Fischerei durchgeführt. Es wurden Erdteiche der Versuchsanlage in Starnberg verwendet, die praxisüblich im Durchlauf betrieben wurden und mit Regenbogenforellen besetzt waren.

Wasserproben wurden aus dem Ablauf (0,2-1 l Probenvolumen) genommen und mit einem Feinsieb vorfiltriert. Für die Cortisolbestimmung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent) werden nur 2 x 100 µl benötigt. Dadurch kann das Volumen zum Eluieren der Säulen von 1 ml auf 0,2 ml verringert werden. Die Nachweisgrenze verringert sich hiermit um den Faktor 5 von 1 ng/l auf 0,2 ng/l. Durch eine manuelle Extraktion konnte mittels Vakuum einer Wassermenge von bis zu 1 l die Messgrenze um den Faktor 10 gesenkt werden. Die Extraktion fand mit Festphasensäulen aus Polystyrol-divinylbenzol Absorberharz (HR-X, 3 ml, 200 mg, Macherey und Nagel

GmbH, Dören) statt. Die Proben wurden mit 5 ml Wasser gewaschen und mit Druckluft (3 min) getrocknet. Die Cortisolmessung fand über das antikörperbasierte Nachweisverfahren ELISA (DES6611 Cortisol free in saliva, Demeditec Diagnostic GmbH, Kiel) statt. Das Cortisol wurde mit Ethylacetat eluiert, im Luftstrom verdampft und die Rückstände in 200 µl Wasser gelöst.

### Ergebnisse

Die Nachweisgrenzen für diese ASPEC-Methode (100 ml) liegt bei 0,2 ng/l, bei der manuellen Filtration (bis 1 l) bei 0,02 ng/l. Die ASPEC-Messgrenze von 0,2 ng entspricht bei einer Ruhecortisolfreisetzung von 20-40 ng/kg/h einer maximalen Durchlaufmenge von etwa 100-200 l/kg/h, um basale stresswerte messen zu können. Für die ASPEC-Methode ergab sich bei einer Ruhecortisolfreisetzung von 25 ng/kg/h in einem 35 m<sup>3</sup>-Teich folgendes Verhältnis aus Durchflussmenge und Besatzdichte (Tabelle 1). Im Ergebnis ist festzustellen, dass lediglich bei höheren Besatzdichten und geringen Wasserdurchflussmengen verlässliche Messwerte erhalten werden konnten, wobei die praktizierte Aufkonzentrierung des Cortisols mittels Festphasenextraktion zu einer wesentlichen Erweiterung der Aussagefähigkeit der durchgeführten Beprobungen führte.

*Tabelle 1: Cortisolkonzentration in Abhängigkeit von Besatzdichte und Durchflussmenge, Rechenbeispiel für ein Forellenteich von V=35 m<sup>3</sup>, und einer Ruhecortisolproduktion von 25 ng/kg/h. Die Nachweisgrenze der bisher verwendeten Methode lag ursprünglich bei 1 ng/l und konnte durch die Methodenoptimierung auf 0,2 ng/l abgesenkt werden.*

|                                   |    | Durchflussmenge [l/s] |          |                   |          |               |          |
|-----------------------------------|----|-----------------------|----------|-------------------|----------|---------------|----------|
|                                   |    | 1,5                   | 3        | 6,1               | 9,1      | 12,2          | 24,3     |
| Besatzdichte [kg/m <sup>3</sup> ] | 25 | 4,0 ng/l              | 2,0 ng/l | 1,0 ng/l          | 0,7 ng/l | 0,5 ng/l      | 0,3 ng/l |
|                                   | 20 | 3,2 ng/l              | 1,6 ng/l | 0,8 ng/l          | 0,5 ng/l | 0,4 ng/l      | 0,2 ng/l |
|                                   | 15 | 2,4 ng/l              | 1,2 ng/l | 0,6 ng/l          | 0,4 ng/l | 0,3 ng/l      | 0,2 ng/l |
|                                   | 10 | 1,6 ng/l              | 0,8 ng/l | 0,4 ng/l          | 0,3 ng/l | 0,2 ng/l      | 0,1 ng/l |
|                                   | 5  | 0,8 ng/l              | 0,4 ng/l | 0,2 ng/l          | 0,1 ng/l | 0,1 ng/l      | 0,1 ng/l |
|                                   |    |                       |          |                   |          |               |          |
|                                   |    | Ürspr. Messbereich    |          | Neuer Messbereich |          | Nicht messbar |          |

### Diskussion

Praxistests in Forellenzuchten konnten zeigen, dass die Cortisolkonzentration (ng/l) im Haltungswasser gemessen werden kann. Berechnungen der spezifischen Cortisolfreisetzungsrates (ng/kg/l) werden aber in der Praxis durch ungenaue Rahmendaten (Fisch-Biomasse, Wasserdurchlaufrate) limitiert und gestalten sich schwierig.

Verglichen mit der Bestimmung des Blutcortisolwerts ist die Analytik wesentlich komplexer, da für eine akkurate Bestimmung der spezifischen Cortisolproduktionsraten genaue Angaben zur Biomasse, des Wasservolumens und der Durchflussmenge benötigt werden. Des Weiteren sind die Cortisolkonzentrationen im Wasser nur sehr gering ( $\sim 0.1\text{-}1\%$  des Blutwerts), daher muss das Cortisol vor den Analysen über Festphasenextraktion aufkonzentriert werden, bevor die Cortisolmenge über antikörper-basierte Nachweisverfahren bestimmt werden kann (z.B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay/ELISA, oder Radioimmunoassays/RIA).

Der generelle Einsatz der Stressmessung in Fischzuchten kann (v.a. für Einzelmessungen) nur empfohlen werden, wenn exakte Daten zu Haltungsvolumen, Fischbestand und Wasserzulauf bekannt sind. Unter kontrollierten Bedingungen, z.B. in kleinen, gleichförmigen und gut beschriebenen Versuchseinheiten kann die Methode sinnvoll eingesetzt werden. Akkurate Massenbalancen sind nötig, um spezifische Cortisol-Freisetzungsraten zu bestimmen. Unter den Bedingungen einer praktisch arbeitenden Teichanlage mit Erdteichen basieren die Berechnungen oft auf ungenauen Schätzwerten. Zusätzlich können inhomogene Fischverteilung und nicht-ideale Strömungsverhältnisse die Messergebnisse verzerren.

Unabhängig von der Komplexität der Analysen hat dieser Ansatz das einmalige Potential, objektive Daten zu Stress in Fischen unter verschiedenen praxisnahen Produktionsbedingungen zu liefern, und einen konstruktiven Beitrag zur Diskussion des Tierwohls in der Aquakultur zu leisten. Für die Zukunft könnte die nicht-invasive Stressmessung in der Aquakultur bzw. im Haltungswasser ein wichtiges Werkzeug für die Haltungsoptimierung und Stressreduktion im laufenden Betrieb sein.

#### **Literatur**

- Ellis T, James JD, Stewart C, Scott P (2004). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 65:1233-1252.
- Kleingeld DW, Moritz J, Reiser S, Steinhagen D, Wedekind H (2018). Leitfaden „Tierschutzindikatoren“. Verband Deutscher Fischereiverwaltungsbeamter und Fischereiwissenschaftler e.V., 29 S.
- Lübke K, Wedekind H, Steinhagen D (2014). Untersuchung zur Reaktion von Aquakulturfischen auf akuten Stress durch praxisübliche Manipulation. XV. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der EAAP, 08. – 10.10.2014, Starnberg. LfL-Schriftenreihe, Fischgesundheit und Fischerei im Wandel der Zeit, Hrsg.: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, 246-249.

Wedekind H (2014). Tierwohl in der Fischhaltung. XV. Gemeinschaftstagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Sektion der EAAP, 08. – 10.10.2014, Starnberg. LfL-Schriftenreihe, Fischgesundheit und Fischerei im Wandel der Zeit, Hrsg.: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, 65–70.

Wedekind H, Schreckenbach K (2003). Investigations on the effect of angling on stress response in rainbow trout. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 23:235-240

Poster: Neue Haltungsformen und Haltungsarten

## **Untersuchungen zum Einfluss der Besatzdichte auf die Wachstumsleistung und Qualität von Afrikanischen Welsen (*Clarias gariepinus*) in Warmwasser-Kreislaufanlagen**

Patrick Keferloher<sup>1</sup>, Helmut Wedekind<sup>2</sup>, Leonhard Durst<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Markgrafenstr. 16, 91746 Weidenbach

<sup>2</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Weihenheimer Straße 8, 82319 Starnberg

### **Zusammenfassung**

Die Besatzdichte ist in der intensiven Aquakultur einer der wichtigsten produktions-technologischen Parameter, dem auch hinsichtlich des Tierwohls große Bedeutung zugeschrieben wird. In der vorliegenden Studie wurden Afrikanische Welse (*Clarias gariepinus*) bei zwei unterschiedlich hohen Besatzdichten aufgezogen und deren Auswirkung auf die Wachstumsleistung, Fischverluste und die Fischqualität, sowie auf das Verhalten der Tiere untersucht. In dem 61-tägigen Versuchszeitraum wurden insgesamt 195 Tiere in sechs gleichartigen Warmwasser-Kreislaufsystemen unter praxisnahen Bedingungen und bei bedarfsgerechter Fütterung aufgezogen.

Die Auswertung des Versuchs ergab keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der Wachstumsleistung und bei der Mortalität. Hinsichtlich der Fischqualität ergaben sich deutliche Unterschiede bei der Gonadenentwicklung. Bei geringer Bestandsdichte war die Geschlechtsreife wesentlich weiter fortgeschritten. Haut- und Flossenläsionen durch Kannibalismus waren häufiger bei der geringen Besatzdichte festzustellen. Das äußere Erscheinungsbild der Welse war in den drei dicht besetzten Parallelen besser, d.h. die Fische waren unversehrt. Verhaltensbeobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Fische in den geringer besetzten Becken dem größeren sozialen Stress durch innerartliche Aggression ausgesetzt waren, der sich in der verfrühten Gonadenreife und häufigeren Verletzungen widerspiegelt.

### **Summary**

Stocking density is one of the most significant parameters in intensive aquaculture, which is considered to be of great importance in terms of animal welfare. In the present study, African catfish (*Clarias gariepinus*) were reared in two different stocking densities. Their effect on growth performance, mortal-

ity, fish quality, and fish behavior were investigated. In the experimental period of 61-days, a total of 195 catfish were raised in 6 parallel RAS-Systems under similar-to-practice conditions, fed with a suitable diet.

The evaluation of the experiment showed no differences in growth performance and mortality. In terms of fish quality, there were clear differences in gonadal maturation: At low stocking density, the gonad development was significantly advanced. Skin and fins lesions, which were due to cannibalism, were more frequent under low stocking density. The exterior fish quality of the catfish was better in the three more densely stocked parallels. Behavioral observations throughout the experiment lead to the suggestion, that the individuals in less populated basins were exposed to greater social stress and intraspecific aggression, e.g. indicated by pre-maturation and more frequent injuries.

#### Material und Methoden

In einer 2-monatigen Testperiode wurden in sechs gleichartigen Kreislaufanlagen insgesamt 195 Versuchstiere bei bedarfsgerechter Fütterung in der Vormast (ca. 20 bis 500 g) praxisähnlich aufgezogen. Dabei wurden zwei Besatzdichten in jeweils 3 Parallelen realisiert:

Gruppe 1 (V1): geringe Endbesatzdichte ( $28 \text{ kg/m}^3$ )

Gruppe 2 (V2): hohe Endbesatzdichte ( $44 \text{ kg/m}^3$ )

Neben der Erfassung technologischer Parameter (Stückmassenentwicklung, Mortalität, Futterquotient (FQ), Korpulenzfaktor) wurden die Geschlechtsreife (GSI) und die äußere Qualität (Haut- und Flossenzustand) der Welse ermittelt (Abb.1 und 2). Zudem erfolgten eine regelmäßige Dokumentation der Wasserqualität sowie Verhaltensbeobachtungen.



Abbildung 1: Ovarien zweier weiblicher Versuchstiere (links: unreif, rechts: reif).





Abbildung 2: Äußeres Erscheinungsbild zweier Versuchstiere (links: unversehrt, rechts: starke Haut- und Flossenläsionen).

### Ergebnisse

In beiden Besatzdichten ergaben sich zu Versuchsende keine signifikanten Unterschiede in der Futterverwertung und der Gewichtsentwicklung, die Mortalität betrug bei beiden Versuchsgruppen 6,7 %.

Signifikante Unterschiede konnten bei der Gonadenreife festgestellt werden: Bei geringem Fischbesatz war der GSI insbesondere bei den Rogenern höher und die Reifung der Geschlechtsprodukte wesentlich weiter fortgeschritten (Tab. 1). Haut- und Flossenläsionen waren ebenfalls häufiger bei der geringen Besatzdichte festzustellen. Das äußere Erscheinungsbild der Welse war in den drei dicht besetzten Parallelen unversehrt und gleichmäßiger. Die Verhaltensbeobachtungen zeigten in allen gering besetzten Becken über den gesamten Versuchszeitraum eine größere Aktivität und soziale Interaktion (gegenseitiges Jagen) der Welse.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Werte bezüglich der Wachstumsleistung und Fischqualität.

|                                       | V1   | V2   |
|---------------------------------------|------|------|
| Mortalität (in %)                     | 6,7  | 6,7  |
| Futterquotient (FQ)                   | 0,85 | 0,80 |
| Spezifische Wachstumsrate (SGR in %)  | 3,08 | 3,09 |
| Verletzungen (Skala 0-3)              | 1,13 | 0,93 |
| Gonadenreife (Skala 1-3)              | 2,36 | 2,02 |
| Gonadosomatischer Index Rogener (GSI) | 1,74 | 1,47 |

## Diskussion

Die Wahl der richtigen Besatzdichte ist die am meisten kontrovers diskutierte Fragestellung der intensiven Aquakultur. Allgemein scheint ein Zusammenhang zwischen der Besatzdichte und dem Auftreten von Läsionen an Haut und Flossen zu bestehen (Schmidt und Wedekind 2009). Besonders gut erforscht ist dies bei Salmoniden. So konnten Kindschi et al. (1991), Wagner und Bosakowski (1994) und Wagner et al. (1996) bei unterschiedlichen Altersstadien der Regenbogenforelle keinen negativen Einfluss einer hohen Besatzdichte auf die Qualität der Flossen feststellen. Schmidt und Wedekind (2010) stellten sogar bei Regenbogenforellen einen Zusammenhang zwischen geringen Besatzdichten und dem vermehrten Auftreten von Verbißschäden an den Rückenflossen fest. Ähnliches gilt für Seesaiblinge (*Salvelinus alpinus*), bei deren Aufzucht eine hohe Besatzdichte keinen negativen Einfluss (Brown et al. 1992) oder gar positive Auswirkungen auf die Flossenqualität hat (Jobling 1995). Auch bei der vorliegenden Untersuchung bestätigten die Verhaltensbeobachtungen ein vermehrtes aggressives und territoriales Verhalten bei geringen Besatzdichten. Dies resultierte in einer höheren Anzahl an Verletzungen an Haut und Flossen. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Welse bei höherer Bestandsdichte weniger innerartliche Aggression zeigten. Hinsichtlich der Fischqualität zeigte sich eine deutlich fortgeschrittene, verfrühte Gonadenentwicklung bei geringem Besatz, die zu einem schlechteren Ausschachtungsergebnis führten. Dieses Ergebnis zeigt, dass zu geringe Besatzdichten durchaus negative Auswirkungen auf das Tierwohl und die Fischqualität haben können.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Untersuchung im Wachstumsabschnitt der Vormast bei der höheren Endbesatzdichte von 44 kg/m<sup>3</sup> Haltungsvolumen geringerer sozialer Stress als bei Unterbesatz zu beobachten war, der letztendlich zu einer besseren äußeren Produktqualität und geringerer Belastung der Einzelfische führte. Die Ergebnisse stehen damit in guter Übereinstimmung mit Berichten aus der Praxis und wissenschaftlichen Untersuchungen in anderen intensiven Aquakulturverfahren.

## Literatur

- Brown GE, Brown JA, Srivasta RK (1992). The effect of stocking density on the behavior of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). J. Fish. Biol. 41:955-963.
- Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Porter M, Gadd D (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. J. Fish. Biol. 61.3:493-531.

- Jobling M (1995). Feeding of charr in relation to aquaculture. *Nordic. J. Freshw. Res.*, 71:102-112.
- Kindschi GA, Smith CE, Koby Jr RF (1991). Performance of two strains of rainbow trout reared at four densities with supplemental oxygen. *Prog. Fish. Cult.* 49:314-315.
- Schmidt G, Wedekind H (2009). Untersuchungen zur Entstehung von Missbildungen (Flossenschäden) bei Salmoniden in der Aquakultur. In: Kleingeld DW, Steinhagen D (Hrsg.). *Der Weg zum gesunden Fische. XII. Gemeinschaftstagung der EAAP*: 233-234.
- Schmidt G, Wedekind H (2010). Strategien zur Reduzierung von Schäden an Flossen von Forellen in der Aquakultur - Besatzdichte. XIII. Gemeinschaftstagung der EAAP, Krems/Österreich: 224-229.
- ▲ Wagner EJ, Bosakowski T (1994). Performance and behavior of rainbow trout reared in covered raceways. *Prog. Fish. Cult.* 56:123-129.
- Wagner EJ, Routledge DM, Intelmann SS (1996). Fin condition and health profiles of albino rainbow trout reared in concrete raceways with and without cobble substrate. *Prog. Fish Cult.* 58:38-42.
- Wallace JC, Kolbeinshavn AG, Reinsnes TG (1988). The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture* 73.1:101-110.
- Wedekind H (2003). Besatzdichte in der Forellenzucht. *Aquakultur- und Fischereinformation*, 4: 7-10.

**Formatiert:** Englisch (Vereinigtes Königreich)

## Untersuchungen zur Wasserqualität in Kreislaufanlagen durch den Einsatz eines Denitrifikationsfiltermediums

Wedekind, Helmut\*<sup>1</sup>; Burg, Birgit<sup>2</sup>; Kürzinger, Hubert<sup>2</sup>; ter Höfte, Barron Benno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei

<sup>2</sup>) Tetra GmbH Melle

### Zusammenfassung

Für die Untersuchung der Wirksamkeit eines in der Aquaristik bewährten Filtermaterials zur Reduzierung des Nitratgehaltes in der Aquakultur wurde eine experimentelle Untersuchung in Kreislaufanlagen mit Afrikanischen Welsen (*Clarias gariepinus*), Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und tropischen Garnelen (*Litopenaeus vannamei*) durchgeführt. Im parallelen Versuchsansatz wurden intensive Produktionsbedingungen im Süß- und Brackwasser unter hoher Futterlast und bei hohen Tierbestandsdichten getestet. Im Einzelnen sollte untersucht werden, wie sich der Nitratgehalt und andere chemische Wasserparameter unter dem Einfluss des Filtermaterials entwickeln.

Die Untersuchung wurde in 8 parallel betriebenen, baugleichen Versuchskreislaufanlagen am IFI durchgeführt. Die Filterung bestand aus einer mechanischen Vorfilterstufe und einem durchlüfteten Nitrifikationsfilter (Festbett). Betrieben wurde je Tierart ein Kontrollsystem und ein System mit dem zu untersuchenden Filtermedium Tetra BalanceBalls (BB) unter aeroben Bedingungen. Während der Testphase wurde die Parameter der chemischen Wasserqualität analysiert und der Futtereinsatz sowie die Entwicklung der Tierbestände dokumentiert.

Die Wirkung des Filtermaterials auf die Nitratkonzentration setzte nach einer Einlaufzeit von 3 bis 4 Wochen ein. In allen Versuchsvarianten mit BB kam es innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Wochen zu einem Absinken bzw. der Stabilisierung der Nitratwerte deutlich unterhalb von 80 (Afrikanische Welse), bzw. 30 mg/l (Regenbogenforellen) und 20 mg/l (Garnelen). Dieser Effekt setzte sich im weiteren Versuchszeitraum fort. Damit wurde die Wasserqualität hinsichtlich dieses bedeutenden Parameters für alle Versuchstiere in einem physiologisch optimalen Bereich gehalten. Als weiterer Effekt des Filtermaterials war eine kontinuierliche Erhöhung der Karbonathärte zu verzeichnen, was zu einer in Kreislaufanlagen erwünschten pH-Wert-Stabilisierung führte.

Poster: Klimawandel

## Vorläufige Erkenntnisse zum Bachforellensterben an der Isar

Arndt, Daniela\*; Langenmayer, Martin C.; Sutter, Gerd; Fux, Robert

Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, LMU München, Deutschland

Keywords: Bachforellensterben, PKD, brown trout

### Zusammenfassung

Seit vielen Jahren wird im Spätsommer in präalpinen Flüssen ein Bachforellensterben mit Mortalitätsraten bis zu hundert Prozent festgestellt. beobachtet. Klinisch zeigen betroffene Fische hochgradige Apathie, Schwarzfärbung und Kiemenblutungen. Auffällige histologische Befunde sind Leberblutungen– und nekrosen und eine Atrophie der weißen Milzpulpa. Eine infektiöse Ätiologie ist wahrscheinlich, jedoch wurde bislang kein spezifischer Erreger identifiziert. In den letzten Jahren kam es auch in der Isar rund um München zu einer erhöhten Mortalität von Bachforellen in den Sommermonaten. Ziel dieser Studie ist es, das Krankheitsbild betroffener Bachforellen in der Isar zu charakterisieren, um Zusammenhänge zum bereits bekannten Bachforellensterben herzustellen. Diese Studie soll dazu beitragen, die Arterhaltung der Bachforellen zu fördern um letztlich einen sich selbst erhaltenden Bachforellenbestand zu fördern.

Im August 2017 wurden 24 Isar-Bachforellen beprobt, die ausgeprägte Schwarzfärbung und Apathie zeigten und sich bevorzugt im Randbereich des Flusses außerhalb der Strömung aufhielten. Ein umfangreiches Organset wurde parasitologisch, pathologisch und bakteriologisch untersucht.

Befunde wie Nekrosen, die dem pathologischen Bild des Bachforellensterbens entsprechen, wurden lediglich in einem der 24 Fische nachgewiesen. Die Rumpfnieren waren geschwollen und zeigten eine körnige Oberfläche. Die vorläufigen histologischen Ergebnisse zeigten nur wenig histologische Übereinstimmungen mit den Läsionen des Bachforellensterbens präalpiner Flüsse. Die bakteriologische Untersuchung lieferte keine eindeutigen Hinweise auf fischpathogene Keime.

Um einen parasitären Befall durch *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Auslöser der Proliferative Kidney Disease) festzustellen, wurden Proben der Rumpfnieren mittels Real Time PCR und Immunhistochemie untersucht. In 22 Fischen wurde *T. bryosalmonae* DNA nachgewiesen. Rund die Hälfte der Fische zeigte auch in der Immunhistochemie ein positives Ergebnis.

Die vorläufigen Ergebnisse der im Sommer 2017 durchgeführten Untersuchungen liefern keine Hinweise auf die Ätiologie des Bachforellensterbens präalpiner Flüsse. Jedoch wurde eine Infektion mit dem Parasiten *T. bryosalmonae* nachgewiesen, die wahrscheinlich aber nicht alleinig für die Symptomatik der Fische verantwortlich war.

Poster: Freie Themen



## Subtilisin reactions against koi herpesvirus

Jin, Yeonhwa\*<sup>1</sup>; Klafack, Sandro<sup>1</sup>; Becker, Anna<sup>2</sup>; Klemen, Petra<sup>2</sup>; Amtmann, Anette<sup>2</sup>; Christian, Jürgen<sup>3</sup>; Oberle, Martin<sup>4</sup>; Masilko, Jan<sup>4</sup>; Bergmann, Sven<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Institute of Infectology, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany

<sup>2</sup>) Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Bioprocessengineering (BVT), Paul-Gordon-Str. 3, 91052, Erlangen, Germany

<sup>3</sup>) Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Sachgebiet Infektiologie, Eggenreuther Weg 43, 91058, Erlangen, Germany

<sup>4</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Greindorfer Weg 8, 91315, Höchstadt/Aisch, Germany

### Zusammenfassung

Koi herpesvirus (KHV) or Cyprinid Herpesvirus 3 (CyHV-3) causes severe threats to carp aquaculture. It is a virulent herpesvirus which can lead to serious clinical signs and a very high mortality. To prevent after an KHV disease (KHVD) outbreak in fish farms, farmers use different sanitizing and disinfection methods in all possible combinations during all seasons: the application of chemical disinfectants in sufficient concentration, ozone treatment and/or UV radiation. In the traditional European pond aquaculture of carp, farmers drain the pond and put quicklime (CaO) up to pH 12 to disinfect against various pathogens. [1] Oxidants (peroxides) and chemical disinfectants are not environmentally friendly methods. An effective, eco-friendly, cheap and affordable disinfectant method is required for aquaculture purpose for prophylaxis but also after an outbreak of a disease.

Non-specific protease, Subtilisin, initially obtained from *Bacillus subtilis* is widely used in commercial products; laundry and dishwashing detergents, cosmetics, food processing, skin care ointments and contact lens cleaners. We observed that it can also inactivate the CyHV-3 infectivity successfully. The viral infectivity was degraded up to 4-folds within 2-24 h by treating the virus in suspension with Subtilisin at 20°C. This indicates that commercial protease (Subtilisin) can be a suitable eco-friendly disinfection method for carp aquaculture.

### Referenzen

[1] Flamm A, Fabian M, Runge M, Böttcher K, Bräuer G, Füllner G, Steinhagen D (2016): Draining and liming of ponds as an effective measure

for containment of CyHV-3 in carp farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120, 255-260 <https://doi.org/10.3354/dao03024>

## Seq, drugs and PKD: An RNA – sequencing analysis of a biological and chemical stressor and their consequences for fish

Bailey, Christyn\*; Rehberger, Kristina; Wernicke von Siebenthal, Elena; Segner, Helmut

University of Bern, Vetsuisse Faculty, Centre for Fish and Wildlife Health

### Abstract:

In nature, organisms are exposed to multiple stressors including biological, chemical and physical entities. Anthropogenic activities have far-reaching effects and have undoubtedly compounded the multiplicity of stressors affecting the planets ecosystems. The cumulative impact of such multiple stressors may result in nonlinear effects and ecological surprises potentially affecting numerous biological targets across varying organizational levels. Examining the roles of multiple stressors is essential if we are to understand how organisms acclimate to environmental change. The aim of the present study was to examine the molecular and organism reaction of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to the combined impact of two environmental stressors: (1) the myxozoan parasite, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, which is the causative agent of proliferative kidney disease (PKD) and naturally affects salmonid populations and (2) an estrogenic active compound, ethinylestradiol (EE2), which is ubiquitously present in the aquatic environment. Both stressors co-exist in Swiss rivers and are potential factors contributing to the decline of Swiss brown trout populations over the last decades. Experimentally, young-of-the-year rainbow trout, were (i) infected with the parasite, *T. bryosalmonae*, (ii) exposed to the environmental contaminant, EE2, or (iii) treated with a combination of the parasite and EE2. In this study, RNA sequencing (RNA-seq) was employed to investigate differentially expressed genes (DEGs) in the kidney of the rainbow trout. Transcriptome sequencing in the abovementioned experimental groups, as well as those without treatment was performed using the Illumina HiSeq 2500 platform. Gene pathway analysis of the DEGs indicated key pathways involved in aspects of adaptive and innate immunity, metabolic processes, extra-cellular matrix components and cellular adhesion and signalling molecules. We report on these pathways and the individual stressors impact and how this changes under exposure to the stressor combinations. Our results provide unprecedented insight into the combined effects of a biological and chemical stressor and their potential physiological and immunological modulations of wildlife.

## **Der Einfluss organischer Düngung auf die Wasserqualität in Karpfenteichen**

Masilko, Jan<sup>1</sup>; Oberle, Martin<sup>1</sup>; Kallert, Dennis<sup>2</sup>; Loy, Christina<sup>2</sup>; Wedekind, Helmut<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Außenstelle für Karpfenteichwirtschaft, Greiendorfer Weg 8, 91315 Höchstadt, Deutschland

<sup>2</sup>) Kallert & Loy GbR, Biologischer Dienst & Projektbüro, Birkenweg 11, 91325 Adelsdorf, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Die Förderung der Naturnahrung ist ein wichtiges Ziel in der traditionellen Karpfenteichwirtschaft. Es kann so wertvolles Eiweiß zur Fischernährung zur Verfügung gestellt werden, ohne auf die Ressource Fischmehl zurückgreifen zu müssen. Zudem ist ein hoher Anteil in der Fischernährung im Hinblick auf die Fleischqualität der Karpfen positiv, da Fische mit niedrigem Fettgehalt bei gleichzeitig gutem Fettsäuremuster (omega-3- Fettsäuren) resultieren. Neben Teichpflegemaßnahmen wie Trockenlegung und Kalkung ist auch die Teichdüngung ein Instrument bei der Teichbewirtschaftung. Idealerweise sollte organischer Dünger in solchen Mengen zugesetzt werden, dass weder die Qualität des Lebensraums für die Fische noch die Wasserqualität des Vorfluters beim Ablassen des Teiches im Herbst beeinträchtigt wird. Das Hauptziel dieser Studie war es, den Einfluss verschiedener organischer Düngemittel auf die Wasserqualität in Karpfenteichen zu untersuchen. Der Versuch wurde in 30 fischfreien, runden Teichparzellen (25 m<sup>2</sup>) in einem Teich mit 3 ha von Anfang Mai bis Ende Juli 2016 durchgeführt. Es wurden 5 Gruppen mit je 6 Wiederholungen gebildet. Vier Düngevarianten (Gras, Stroh, Rindermist und Biogasgärreste) wurden mit einer ungedüngten Kontrolle verglichen. Gedüngt wurde mit 4 t Frischmasse pro Hektar. Die Düngung wurde auf drei Gaben mit je 3,3 kg Frischmasse pro Teichparzelle, beginnend Anfang Mai, im Abstand von 4 Wochen gegeben. Neben Messungen der Temperatur, des Sauerstoffgehaltes, des pH-Wertes und der Sichttiefe wurden die Gehalte von Nitrat, Nitrit, Ammonium-N, SBV (Alkalinität), CSB, o-Phosphat, ges.-Phosphat und ges.-Stickstoff bestimmt.

In allen Parzellen waren fischverträgliche Werte bezüglich aller Parameter über den gesamten Zeitraum zu verzeichnen. Durch die Ausbringung aller verwendeten Düngemittel wurden während des Versuchszeitraumes keine

signifikant erhöhten Werte bezüglich der gemessenen Parameter im Vergleich zur Kontrolle erzeugt. Der CSB-Wert war in allen Gruppen über den Versuchszeitraum gleich der Kontrolle. Es kam teilweise zu einer Verringerung chemischer Wasserparameter. Die Ausbringung von Stroh sorgte für eine Senkung des pH- Wertes, das Einbringen von Gras und Stroh hatte einen deutlichen Effekt im Hinblick auf Senkung des Gehaltes an Ammonium-N. Ges.-Phosphat und o-Phosphat war in den Gruppen mit Mist und Gärresten am Ende des betrachteten Zeitraumes lediglich leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht. Bei den Stickstoff-Verbindungen (Nitrit, Nitrat, Gesamt-N) sorgte die Düngung für keine oder nicht signifikante Erhöhung zum Ende des Versuchszeitraumes. Die Ausbringung von 4 t/ha organischer Düngemittel in drei Gaben bis Anfang Juli in fischfreien Teichparzellen resultierte bis Ende Juli somit nicht in einer negativen Veränderung der Wasserqualität.

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und anderer Formen nachhaltiger Wirtschaft.

## Teilnehmerverzeichnis

| <b>Nachname</b> | <b>Vorname</b>     | <b>Institution</b>                                      | <b>Postleit-<br/>zahl</b> | <b>Ort</b>                | <b>Land</b> |
|-----------------|--------------------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|
| Adamek          | Mikolaj            | Stiftung Tierärztliche Hochschule<br>Hannover           | 30559                     | Hannover                  | Deutschland |
| Arndt           | Daniela            | LMU München   | 80539                     | München                   | Deutschland |
| Ashfaq          | Hassan             | Veterinär-Medizinische Universität                      | 1210                      | Wien                      | Österreich  |
| Bailey          | Christyn           | Universität Bern  | 3012                      | Bern                      | Schweiz     |
| Bauer           | Julia              | Stiftung Tierärztliche Hochschule<br>Hannover           | 30559                     | Hannover                  | Deutschland |
| Becke           | Cornelius          | LAZBW Fischereiforschungsstelle<br>Baden-Württemberg    | 88085                     | Langenargen               | Deutschland |
| Becker          | Anna Maria         | Friedrich-Alexander Universität<br>Erlangen-Nürnberg    | 91052                     | Erlangen                  | Deutschland |
| Bergmann        | Sven M.            | FLI Insel Riems   | 17493                     | Greifswald-Insel<br>Riems | Deutschland |
| Blakey          | Franziska          |   | 35444                     | Biebertal                 | Deutschland |
| Blom            | Mario              | DAP Blom  | 3871MB                    | Hoevelaken                | Niederlande |
| Bornstein       | Stephanie          | CVUA Freiburg,<br>Fischgesundheitsdienst                | 79108                     | Freiburg                  | Deutschland |
| Bräuer          | Grit               | Sächsische Tierseuchenkasse<br>Fischgesundheitsdienst   | 01099                     | Dresden                   | Deutschland |
| Bretzinger      | Achim              | Fischpraxis Dr. Bretzinger                              | 89415                     | Lauingen                  | Deutschland |
| Bula            | Michel             | fishdoc GmbH  | 6026                      | Rain                      | Schweiz     |
| Bulla           | Verena             | LUA Sachsen, Standort Dresden                           | 01074                     | Dresden                   | Deutschland |
| Constantin      | Eleonora-<br>Maria | Chemisches und Veterinär-<br>untersuchungsamt Karlsruhe | 76187                     | Karlsruhe                 | Deutschland |

| <b>Nachname</b> | <b>Vorname</b> | <b>Institution</b>  | <b>Postleit-<br/>zahl</b> | <b>Ort</b>                  | <b>Land</b> |
|-----------------|----------------|---|---------------------------|-----------------------------|-------------|
| Diserens        | Nicolas        | Koipraxis GmbH  | 3302                      | Moosseedorf                 | Schweiz     |
| El-Matbouli     | Mansour        | Veterinär-Medizinische Universität  | 1210                      | Wien                        | Österreich  |
| Erhard          | Marcel         | RIPAC-LABOR GmbH  | 14476                     | Potsdam                     | Deutschland |
| Felten          | Martin         | Tierärztliche Hochschule Hannover   | 30559                     | Hannover                    | Deutschland |
| Fischer         | Uwe            | Bundesforschungsinstitut für Tier-<br>gesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut | 17493                     | Greifswald-Insel<br>Riems   | Deutschland |
| Frank           | Tamara         | Fischpraxis   | 5151                      | Nussdorf am<br>Haunsberg    | Österreich  |
| Frohberg        | Reinhard       |   | 99894                     | Friedrichroda               | Deutschland |
| Geiger          | Tobias         | Bayerisches Landesamt für Umwelt  | 82407                     | Wielenbach                  | Deutschland |
| Grassl          | Karin          | Aquazoo Düsseldorf  | 40233                     | Düsseldorf                  | Deutschland |
| Hetz            | Stefan Karl    |   | 10247                     | Berlin                      | Deutschland |
| Hochwartner     | Oliver         |   | 1230                      | Wien                        | Österreich  |
| Hofmann         | Arndt          | Friedrich-Loeffler-Institut   | 17493                     | Greifswald - Insel<br>Riems | Deutschland |
| Isler           | Melchior       | Universität Bern  | 3012                      | Bern                        | Schweiz     |
| Jin             | Yeonhwa        | Friedrich-Loeffler-Institut   | 17493                     | Greifswald- Insel<br>Riems  | Deutschland |
| Jordan          | Lisa           | Friedrich-Alexander-Universität<br>Erlangen-Nürnberg                          | 91052                     | Erlangen                    | Deutschland |
| Jungnischke     | Robert         | Koi-Consult   | 50389                     | Wesseling                   | Deutschland |
| Jung-Schroers   | Verena         | Tierärztliche Hochschule Hannover   | 30559                     | Hannover                    | Deutschland |
| Klafack         | Sandro         | Friedrich-Loeffler-Institut   | 17493                     | Greifswald - Insel<br>Riems | Deutschland |



| <b>Nachname</b>         | <b>Vorname</b> | <b>Institution</b>   | <b>Postleit-<br/>zahl</b> | <b>Ort</b>     | <b>Land</b> |
|-------------------------|----------------|--|---------------------------|----------------|-------------|
| Kleingeld               | Dirk Willem    | LAVES  | 30175                     | Hannover       | Deutschland |
| Knopf                   | Klaus          | Leibniz-Institute of Freshwater<br>Ecology and Inland Fisheries                | 12587                     | Berlin         | Deutschland |
| Knüsel                  | Ralph          | fishdoc GmbH   | 6026                      | Rain           | Schweiz     |
| Lany                    | Catharina      |  | 3182                      | Ueberstorf     | Schweiz     |
| Lechleiter              | Sandra         | fischcare Dr. Lechleiter   | 75305                     | Neuenbürg      | Deutschland |
| Lewisch                 | Eva            | Veterinärmedizinische Universität  | 1210                      | Wien           | Österreich  |
| Lippert-<br>Petscharnig | Melanie        | Institut für Lebensmittelsicherheit,<br>Veterinärmedizin und Umwelt<br>Kärnten | 9020                      | Klagenfurt     | Österreich  |
| Martin                  | Petra          | Landesamt für Verbraucherschutz<br>Sachsen-Anhalt, FB Veterinärmedizin         | 39576                     | Stendal        | Deutschland |
| Nardy                   | Elisabeth      | CVUA Stuttgart   | 70736                     | Fellbach       | Deutschland |
| Pietsch                 | Constanze      | ZHAW Wädenswil   | 8820                      | Wädenswil      | Schweiz     |
| Regazzoni               | Luca           | ZHAW Wädenswil   | 8750                      | Glarus         | Schweiz     |
| Rhyner                  | Nicola         | ZHAW Wädenswil   | 8805                      | Richterswil    | Schweiz     |
| Ros                     | Albert         | LAZBW  | 88085                     | Langenargen    | Deutschland |
| Rucker                  | Ute            | Koipraxis Bretzinger   | 86161                     | Augsburg       | Deutschland |
| Rudloff                 | Ester          | CVUA Freiburg - THI  | 79108                     | Freiburg       | Deutschland |
| Rupp                    | Melanie        | Universität Bern   | 3001                      | Bern           | Schweiz     |
| Schleicher              | Anne           | Kleintierpraxis  | 41352                     | Korschenbroich | Deutschland |
|                         | Christine      | Dr. Anne Christine Schleicher  |                           |                |             |
| Schletz                 | Bettina        |  | 89075                     | Ulm            | Deutschland |

| <b>Nachname</b>      | <b>Vorname</b> | <b>Institution</b>                        | <b>Postleit-<br/>zahl</b> | <b>Ort</b>  | <b>Land</b> |
|----------------------|----------------|---|---------------------------|-------------|-------------|
| Schmidt-<br>Posthaus | Heike          | Universität Bern                          | 3012                      | Bern        | Schweiz     |
| Schumacher           | Ilka           | Fischpraxis Rheintal                      | 9463                      | Oberriet    | Schweiz     |
| Segner               | Helmut         | Universität Bern                          | 3012                      | Bern        | Schweiz     |
| Seibel               | Henrike        | Gesellschaft für Marine Aquakultur        | 25761                     | Büsum       | Deutschland |
| Seitz                | Andreas        | ZHAW Wädenswil                            | 9470                      | Buchs       | Schweiz     |
| Silbermann           | Bernhard       | ZZF                                       | 66822                     | Lebach      | Deutschland |
| Steinbauer           | Peter          | Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.         | 85586                     | Poing       | Deutschland |
| Steinhagen           | Dieter         | Tierärztliche Hochschule Hannover         | 30559                     | Hannover    | Deutschland |
| Teitge               | Felix          | Tierärztliche Hochschule Hannover         | 30559                     | Hannover    | Deutschland |
| ter Höfte            | Barron Benno   | Tetra GmbH                                | 49324                     | Melle       | Deutschland |
| Tschirren            | Linda          | Zürcher Fachhochschule                    | 8820                      | Wädenswil   | Schweiz     |
| Untergasser          | Dieter         |   | 64720                     | Michelstadt | Deutschland |
| von Siebenthal       | Beat           | Universität Bern                          | 3012                      | Bern        | Schweiz     |
| Wahli                | Thomas         | Universität Bern                          | 3012                      | Bern        | Schweiz     |
| Waldner              | Karoline       | Veterinärmedizinische Universität         | 1220                      | Wien        | Österreich  |
| Wedekind             | Helmut         | Institut für Fischerei der LfL            | 82319                     | Starnberg   | Deutschland |
| Weirup               | Lina           | Gesellschaft für Marine Aquakultur<br>mbH | 25761                     | Büsum       | Deutschland |
| Wimmer               | Andreas        | Tiergesundheitsdienst Bayern              | 90441                     | Nürnberg    | Deutschland |
| Wortberg             | Falk           | Tierärztliche Praxis für Fische           | 57462                     | Olpe        | Deutschland |

## Sponsorenliste



HOFMANN NUTRITION AG  
Tierernährung / Animal Nutrition  
/ Nutrition Animale  
CH-4922 Bützberg  
Schweiz  
Tel. +41 (0)62 958 80 80



WZF  
Wirtschaftsgemeinschaft Zoolo-  
gischer Fachbetriebe GmbH

ZFF  
Zentralverband Zoologischer  
Fachbetriebe Deutschlands e.V.

Mainzer Strasse 10  
65185 Wiesbaden  
Deutschland



RIPAC-Labor GmbH  
Am Mühleberg 11  
14476 Potsdam  
Deutschland



MSD Animal Health GmbH  
Weyrstrasse 20  
6006 Luzern  
Schweiz



Fischtechnik GmbH  
Feldernstrasse 68  
3113 Rubigen  
Schweiz  
+41 (0)31 722 00 20  
info@fischtechnik.ch



WATER – proved GmbH  
Wassermesstechnik & Aquakultur  
Georg-Zorn-Strasse 37  
90765 Fürth  
Deutschland



DURAtec AG  
Zelglimatte 3  
Postfach 132  
6260 Reiden  
Schweiz



Verband Schweizer Fischzüchter  
Association de Piscicultures  
Suisse  
c/o Pisciculture de Vionnaz Hess  
SA  
Av. Des Baumettes 3  
1020 Renens  
Schweiz



Sera GmbH  
Postfach 1466  
52518 Heinsberg  
Deutschland



Koi-Breeder AG  
Gewerbstrasse 11  
5107 Schinznach-Dorf  
Schweiz  
+41 (0) 56 463 64 06